

Aus dem Medizinischen Zentrum für Kinder- und Jugendmedizin des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg in Zusammenarbeit mit dem Zentrum für Kinder- und Jugendmedizin sowie dem Institut für Humangenetik des Universitätsklinikums Heidelberg

Direktor der Klinik für Kinder- und Jugendmedizin des Universitätsklinikums Marburg:

Prof. Dr. med. R.F. Maier

Ärztlicher Direktor der Klinik Kinderheilkunde I des Universitätsklinikums Heidelberg :

Prof.Dr.med.,Prof.h.c.(RCH) G.F.Hoffmann

Geschäftsführender Direktor des Institutes für Humangenetik der Universität Heidelberg:

Prof. Dr. med. C.R. Bartram

---

# **Denaturierungsgradientengelelektrophorese (DGGE) für die molekulare Diagnostik des Ornithin-Transcarbamylase (OTC-) Mangels**

## **INAUGURAL-DISSERTATION**

**zur**

**Erlangung des Doktorgrades der gesamten Humanmedizin**

**dem Fachbereich Medizin  
der Philipps-Universität Marburg  
vorgelegt von**

**Astrid Preuße**  
geb. Knauer  
aus Löbau

**Marburg 2008**

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg am:  
24.01.2008

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs.

Dekan:	Prof. Dr. M. Rothmund
Referent:	Prof. Dr. Dr. J. Zschocke
Korreferent:	Prof. Dr. M. Koch

---

## INHALTSVERZEICHNIS

### Kapitel I EINLEITUNG

<b>A</b>	<b>Einführung.....</b>	<b>1</b>
<b>B</b>	<b>Biochemische Grundlagen .....</b>	<b>3-17</b>
1	Der Harnstoffzyklus .....	3
2	Die Ornithintranscarbamylase .....	8
3	Struktur des <i>OTC</i> -Gens .....	14
<b>C</b>	<b>Klinische und molekulare Grundlagen .....</b>	<b>18-37</b>
1	Erbliche Harnstoffzyklusdefekte .....	18
2	Das klinische Bild des <i>OTC</i> -Mangels .....	21
3	Molekulare Basis .....	23
4	Diagnose .....	26
5	Therapie .....	34
6	Prognose .....	37
<b>D</b>	<b>Ziele der Untersuchung .....</b>	<b>38</b>

### Kapitel II MATERIAL UND METHODEN

<b>A</b>	<b>Methodenwahl .....</b>	<b>39-46</b>
1	Molekulargenetische Diagnostik .....	39
2	Methode der Wahl .....	43
<b>B</b>	<b>Materialien und Protokolle .....</b>	<b>47-60</b>
1	DNA-Extraktion .....	47
2	Primer .....	49
3	Die Polymerasekettenreaktion.....	52
4	Agarose Gelelektrophorese der PCR-Produkte .....	55
5	DGGE .....	56
6	Sequenzierung der DNA .....	58
<b>C</b>	<b>Patientendaten .....</b>	<b>61-66</b>
1	Validierung .....	61
2	Prospektive Untersuchung bei Verdacht auf <i>OTC</i> -Mangel .....	63

**Kapitel III      ERGEBNISSE**

<b>A</b>	<b>Übersicht .....</b>	<b>67-72</b>
<b>B</b>	<b>Darstellung der Analyseergebnisse .....</b>	<b>73-93</b>
	Exon 1 .....	73
	Exon 2 .....	75
	Exon 3 .....	78
	Exon 4 .....	79
	Exon 5 .....	81
	Exon 6 .....	85
	Exon 7/ 8 .....	90
	Exon 9 .....	91
	Exon 10 .....	93
<b>C</b>	<b>Darstellung der Analyseergebnisse für die Indexpatienten .....</b>	<b>94-101</b>
	Indexpatient 59 .....	94
	Indexpatient 60 .....	95
	Indexpatient 61 .....	97
	Indexpatient 62 .....	98
	Indexpatient 63 .....	100

**Kapitel IV      DISKUSSION**

<b>A</b>	<b>Allgemeine Betrachtung der DGGE Analytik.....</b>	<b>102-110</b>
<b>B</b>	<b>Familienbesprechung .....</b>	<b>111-120</b>
	Indexpatient 54 u. 55 .....	111
	Indexpatient 56 .....	112
	Indexpatient 57 .....	113
	Indexpatient 58 u. 59 .....	114
	Indexpatient 60 .....	114
	Indexpatient 61 .....	116
	Indexpatient 62 .....	117
	Indexpatient 63 .....	118
<b>C</b>	<b>Schlußbetrachtung .....</b>	<b>121</b>
	Aussichten .....	122-124
<b>V</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>125</b>
<b>VI</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>127</b>
<b>VII</b>	<b>VERZEICHNIS DER AKADEMISCHEN LEHRER</b>	<b>135</b>
<b>VIII</b>	<b>DANKSAGUNG</b>	<b>136</b>

**ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS**

bp	Basenpaare
DGGE	Denaturierungs-Gradienten-Gelelektrophorese
EC-Nummern	Enzyme Commission numbers (numerisches Klassifikationssystem für Enzyme)
Hsp	Heat shock protein (Hitzeschockprotein)
kDa	Kilodalton
MIM	Mendelian Inheritance in Man
OTC	Ornithintranscarbamylase
SSCP	Single-Strand Conformational Polymorphism
UTR	untranslated region

# KAPITEL I

## A Einführung

Der Harnstoffzyklus bildet die Grundlage für die Bildung von Harnstoff als unschädliches Stickstoffausscheidungsprodukt. In diesen Stoffwechselprozeß sind im wesentlichen 6 Enzyme involviert. Die Ornithin Transcarbamylase (OTC, EC 2.3.1.3) dient als mitochondriales Matrixenzym im zweiten Schritt des Harnstoffzyklus der Umwandlung von Ornithin und Carbamylphosphat zu Citrullin. Der OTC-Mangel ist der häufigste angeborene Harnstoffzyklusdefekt (Brusilow und Horwich 2000) und wurde erstmals in den 60er Jahren von Russell *et al.* beschrieben (Russell *et al.* 1962).

Das die humane OTC codierende Gen wurde in den 80er Jahren auf dem X-Chromosom lokalisiert und unterliegt der X-Inaktivierung bei Frauen. Nach der Lyon-Hypothese, von Mary Lyon 1961 postuliert, ist in somatischen Zellen normaler weiblicher Säuger jeweils eines der beiden X-Chromosomen weitgehend inaktiviert. Da in manchen Zellen das inaktive X-Chromosom väterlicher, in andern Zellen mütterlicher Herkunft ist, können in einem Gewebe X-chromosomale Merkmale mosaikartig verteilt sein (Lyon 1961).

Für den OTC-Mangel wie für viele andere X-chromosomale Krankheiten gilt, dass hemizygoten Männer fast immer klinisch symptomatisch werden, während heterozygote Frauen abhängig vom Lyonisierungsmuster in der Leber klinische Symptome zeigen oder klinisch asymptomatisch bleiben (Tuchman *et al.* 2000).

Die Variabilität bzw. Heterogenität des OTC-Mangels war und ist auch heute noch Gegenstand vieler Untersuchungen sowohl auf klinischer Ebene als auch auf biochemischer und molekularer Ebene. Seit dem ersten Mutation-Update für das *OTC*-Gen, in welchem 32 Mutationen (große Deletionen ausgeschlossen) beschrieben wurden (Tuchman 1993), sind drei weitere Updates erschienen (Tuchman u. Plante 1995b; Tuchman *et al.* 2002; Yamaguchi *et al.* 2006). Das zuletzt erschienene enthält eine Zusammenfassung von 341 Mutationen sowie 29 nicht pathogene Mutationen und Polymorphismen.

Die Kenntnis des großen Spektrums der Erkrankung ist erforderlich, um Patienten rechtzeitig diagnostizieren zu können und schließlich durch Einleiten entsprechender Therapien die Folgen der Hyperammonämien zu verhindern.

## B Biochemische Grundlagen

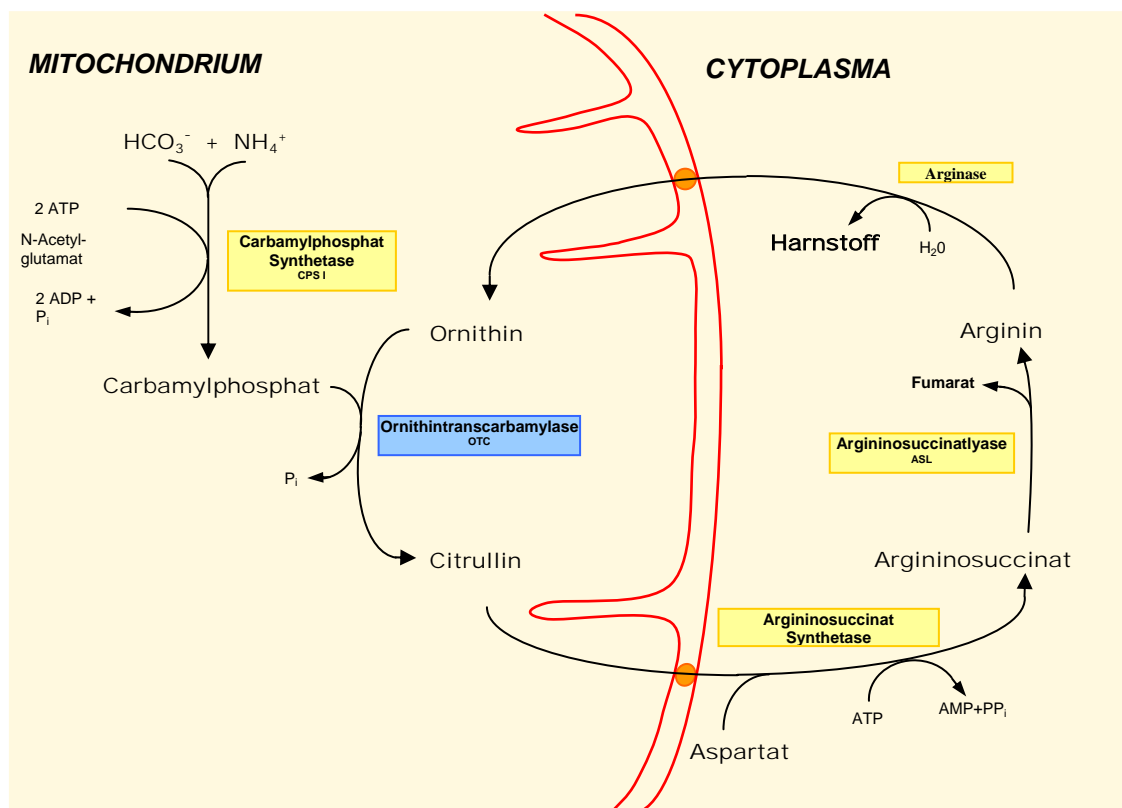
### 1 Der Harnstoffzyklus

Der Harnstoffzyklus, nach den Entdeckern Hans Krebs und dem Medizinstudenten Kurt Henseleit 1932 auch als Krebs-Henseleit-Zyklus bezeichnet, war der erste bekannte zyklisch verlaufende Stoffwechselweg.

Er dient zum einen der Entgiftung der beim Abbau von Aminosäuren entstehenden Ammoniumionen durch die Bildung von Harnstoff in der Leber und zum anderen der Synthese von Arginin aus Ornithin.

Die Harnstoffbiosynthese findet in den periportalen Hepatozyten der Leber in zwei Kompartimenten statt, in den Mitochondrien und im Cytoplasma.

Es handelt sich um einen mehrstufigen Kreisprozeß, in dessen Verlauf ein Molekül Harnstoff aus je einem Molekül Ammoniak und Bicarbonat sowie dem Aminostickstoff von Aspartat zusammengesetzt wird.



**Bild 1-1 Die Harnstoffbiosynthese.** Der Zyklus ist in der Leber auf zwei Zellkompartimente (Mitochondrium und Cytosol) verteilt. Die mitochondriale Ornithintranscarbamylase katalysiert die Übertragung des Carbamylrestes auf die Aminosäure Ornithin.

● Ornithin-Citrullin Antioort



Durch das mitochondriale Enzym Carbamylphosphat-Synthetase I wird aus Bicarbonat und Ammoniak Carbamylphosphat gebildet. Unentbehrlicher Cofaktor dieser Reaktion ist N-Acetylglutamat, das als allosterischer Aktivator wirkt und durch die N-Acetylglutamat-Synthetase aus Glutamat und Acetyl-CoA gebildet wird.

Der Carbamylrest von Carbamylphosphat wird im nächsten Schritt auf die nichtproteinogene Aminosäure Ornithin übertragen, wobei Citrullin entsteht; diese Reaktion wird von der Ornithintranscarbamylase katalysiert.

Citrullin tritt durch die Mitochondrienmembran in das Cytosol über, wo es dann durch die Argininosuccinat-Synthetase mit Aspartat zu Argininosuccinat kondensiert wird.

Schließlich spaltet die Argininosuccinatlase das Argininosuccinat in Fumarat und Arginin. Arginase spaltet hydrolytisch aus Arginin Harnstoff ab, unter gleichzeitiger Freisetzung von Ornithin.

Das gebildete Ornithin wird durch den Ornithincarrier aktiv in das Mitochondrium eingeschleust und steht dort wieder als Trägermolekül für den Carbamylrest zur Verfügung.

Die Effizienz des Harnstoffzyklus wird durch die Glutaminasereaktion, durch welche Ammonium aus Glutamin freigesetzt wird, in den Mitochondrien der periportalen Hepatozyten verbessert. Die Umsatzrate des Harnstoffzyklus wird durch eine Erhöhung des Ammoniumangebotes an das erste Enzym im Harnstoffzyklus gesteigert. So führt ein Anstieg der Plasma-Aminosäure-Konzentration zu einem proportional höheren Anstieg der Harnstoffbildung. Während die Induktion der Harnstoffzyklusenzyme bei einer kontinuierlich höheren Proteinzufuhr Stunden bis Tage dauern kann, wird über die Steigerung des Glutamatspiegels vermehrt N-Acetylglutamat gebildet, was eine Schlüsselrolle bei der schnell wirkenden Regulation des Harnstoffzyklus spielt.

Tabelle I-1 Die Enzyme des Harnstoffzyklus.

Enzyme	Abkürzung		Kompartiment	Vorkommen im Gewebe
N-Acetylglutamat-Synthetase	NAGS	EC 2.3.1.1; MIM 237310	Mitochondriale Matrix	Leber, Intestinum, Nieren (in Spuren), Milz
Carbamylphosphat-Synthetase	CPS I	EC 6.3.4.16; MIM 237300	Mitochondriale Matrix	Leber, Intestinum, Nieren (in Spuren)
Ornithintranscarbamylase	OTC	EC 2.1.3.3; MIM 311250	Mitochondriale Matrix	Leber, Intestinum, Nieren (in Spuren)
Argininosuccinat-Synthetase	ASS	EC 6.3.4.5; MIM 215700	Cytoplasma	Leber, Nieren, Fibroblasten, Gehirn (in Spuren)
Argininosuccinat-Lyase	ASL	EC 4.3.2.1; MIM 207900	Cytoplasma	Leber, Nieren, Gehirn, Fibroblasten
Arginase	ARG I	EC 3.5.3.1; MIM 207800	Cytoplasma	Leber, Erythrozyten, Nieren, Linse, Gehirn (in Spuren)

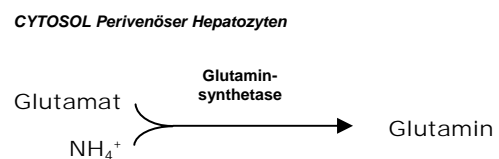
Die Aktivität der Enzyme des Harnstoffzyklus konnte bereits in der 10.-13. Schwangerschaftswoche (SSW) nachgewiesen werden.

Ungefähr in der 20. SSW entspricht die Enzymaktivität der Aktivität zum Geburtszeitpunkt und beträgt ca. 50-90 Prozent der bei Erwachsenen vorhandenen Enzymaktivität (Raiha *et al.* 1968; Baig *et al.* 1992).

### 1.1 Alternative Wege der Ammoniakeliminierung

Eine Reduktion der Harnstoffbiosynthese in den periportalen Hepatozyten führt zu einem Anstieg der Ammoniakkonzentration.

Eine Fixierung von Ammoniak als Glutamin wird durch die Glutaminsynthetasereaktion gewährleistet.



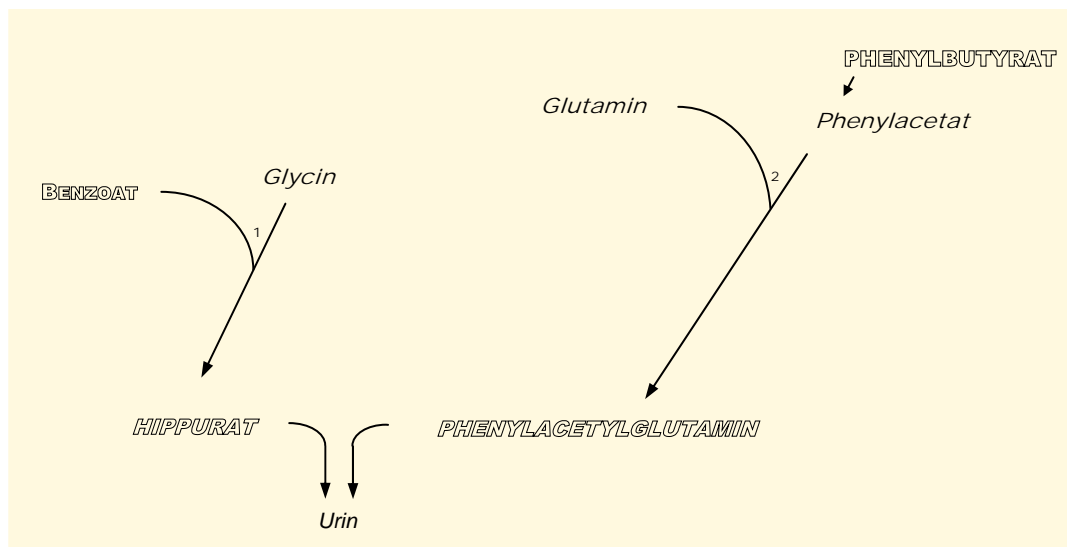
Die Glutaminsynthetase ist ausschließlich in den perivenösen Hepatozyten lokalisiert.

Die über die Pfortader zuströmenden Ammoniumionen werden zu etwa 70 Prozent durch die periportale Harnstoffbiosynthese entgiftet. Die restlichen 30 Prozent werden durch die Glutaminbiosynthese entgiftet. Durch diese Zonierung werden die nicht im Harnstoffzyklus fixierten Ammoniumionen eliminiert, bevor sie die systemische Zirkulation erreichen.

Die Existenz von Stoffwechselwegen, deren Produkte eine Alternative zur Harnstoffbiosynthese sind, wurde schon vor sehr langer Zeit gezeigt. Man stellte fest, dass durch die Gabe von Benzoat oder Phenylbutyrat die Ausscheidung von Harnstoff abnahm und anstatt dessen Hippurat beziehungsweise Phenylacetylglutamin im Urin ausgeschieden wurden (Lewis 1914; Shiple u. Sherwin 1922).

Brusilow et al. nutzten diese Ergebnisse als therapeutischen Ansatz bei Patienten mit Harnstoffzyklusdefekten (Brusilow *et al.* 1980).

Die folgende Darstellung soll den alternativen Stoffwechselweg der Stickstoffeliminierung bei Patienten mit OTC-Mangel durch die Verabreichung von Benzoat und Phenylbutyrat verdeutlichen.



**Bild 1-2 Alternative Stoffwechselwege zur Stickstoffeliminierung bei Patienten mit OTC-Mangel.** Die Enzyme Benzoyl CoA-Glycin-Acyltransferase (1) sowie Phenylacetyl CoA-Glutamin-Acetyltransferase (2) sind an den Umwandlungen beteiligt. Alanin, Glutamat, Serin, Glycin und Glutamin fungieren als Stickstoffatomdonatoren bei der Bildung der beiden ausscheidungsfähigen Produkte Hippurat und Phenylacetylglutamin. (Brusilow und Horwich 1995)

Ein für Glycin (= 1 Aminogruppe) spezifisches Enzym, Benzoyl CoA-Glycinacyltransferase (EC 2.3.1.13), katalysiert die Bildung einer Peptidverknüpfung, die für die Synthese von Hippurat erforderlich ist. Ein für Glutamin (= 2 Aminogruppen) spezifisches Enzym, Phenylacetyl CoA-Glutaminacetyltransferase (EC 2.3.1.68), katalysiert die Bildung einer Peptidverknüpfung, die für die Synthese von Phenylacetylglutamin erforderlich ist.

Diese beiden mitochondrialen Enzyme sind in Leber und Niere lokalisiert (Webster *et al.* 1976; Killenberg u. Webster 1980; Moldave u. Meister 1957).

Glycin wird aus Serin resynthetisiert, welches durch Transamination mit Alanin oder Glutamat als Aminogruppendonatoren, aus 3-Phosphohydroxypyruvat entsteht. Glutamin entsteht durch Amidation von Glutamat. Durch die Verabreichung von Benzoat und Phenylbutyrat kann Stickstoff in alternative Stoffwechselwege einfließen und somit den Harnstoffzyklus entlasten.

## 2 Die Ornithintranscarbamylase

### 2.1 Allgemeine Aspekte

Die Ornithintranscarbamylase (OTC, EC 2.1.3.3) ist ein mitochondriales Matrixenzym, welches hauptsächlich in der Leber und in geringerem Maß auch in der Mucosa des Dünndarms exprimiert wird. Die Untereinheiten werden an den freien Polyribosomen im Cytoplasma als Precursor von etwa 40 kDa synthetisiert und posttranslational in das Mitochondrium geschleust (Horwich *et al.* 1985a). OTC wurde eingehend als ein Modell zur Erklärung, wie cytosolisch synthetisierte Precursor-Proteine in das Mitochondrium geschleust werden, studiert.

Die humane OTC wurde erstmals 1978 gereinigt und als Homotrimer mit 322 Aminosäuren und einem Molekulargewicht von etwa 36000 Daltons per Polypeptidkette dargestellt (Kalousek *et al.* 1978).

Derzeit sind 341 Mutationen sowie 29 nicht pathogene Mutationen und Polymorphismen beschrieben (Yamaguchi *et al.* 2006), und zahlreiche biochemische Studien von mutanter humaner OTC sind berichtet worden. Für ein besseres Verständnis der Effekte von Mutationen im *OTC*-Gen sind Strukturanalysen des Enzyms unerlässlich. Mit Hilfe der Röntgenstrukturanalyse wurde die dreidimensionale Struktur der humanen OTC aufgeklärt (Shi *et al.* 1998).

### 2.2 Struktur der OTC

Die humane OTC gehört zur Gruppe der Transcarbamylase-Enzyme. Diese Gruppe von Enzymen ist für die Übertragung einer Carbamylgruppe von Carbamylphosphat (CP) auf die Aminogruppe eines weiteren Substrates, welches hier L-Ornithin ist, verantwortlich.

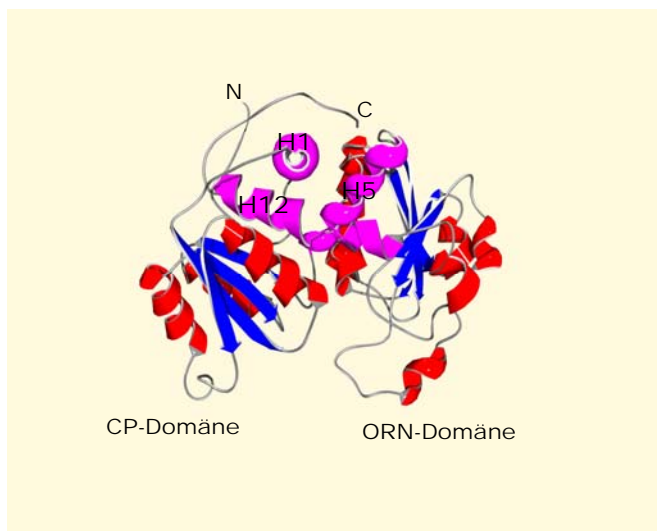
Kristallographische Untersuchungen der katabolischen *Pseudomonas aeruginosa* OTC und der anabolischen *Pseudomonas furiosus* OTC (Villeret *et al.* 1995 u. Villeret *et al.* 1998) sowie der anabolischen *Escherichia coli* OTC (Jin *et al.* 1997 u. Ha *et al.* 1997) und der humanen OTC (Shi *et al.* 1998), zeigten eine ähnliche Tertiärstruktur der Enzyme, welche auch der katalytischen Untereinheit der Aspartat-Transcarbamylase (ATC) ähnlich ist.

Jede Untereinheit weist eine bilobale Struktur mit einer Bindungsstelle für CP an der Basis der Spalte zwischen den beiden Lappen und eine L-Ornithin Bindungsstelle am Rand der Spalte auf. Binden beide Substrate, schwingt der SMG-Loop (Ser-Met-Gly-Motiv; Reste 263-286 in der humanen OTC) in Richtung des aktiven Zentrums, um die Spalte zu verdecken und eine Interaktion der beiden Substrate zu ermöglichen (Shi *et al.* 2001).

Durch die experimentelle Bestimmung der ultravioletten Absorption konnte gezeigt werden, dass das Binden des ersten Substrates CP an die humane OTC die größte Konformationsänderung bewirkt. Um die Rolle von CP im Hinblick auf die Konformationsänderung zu klären und endgültig die Substraterkennung des Enzyms zu verstehen, war es notwendig, die Strukturen des Binärkomplexes der humanen OTC mit CP als Substrat zu analysieren (Shi *et al.* 2001).

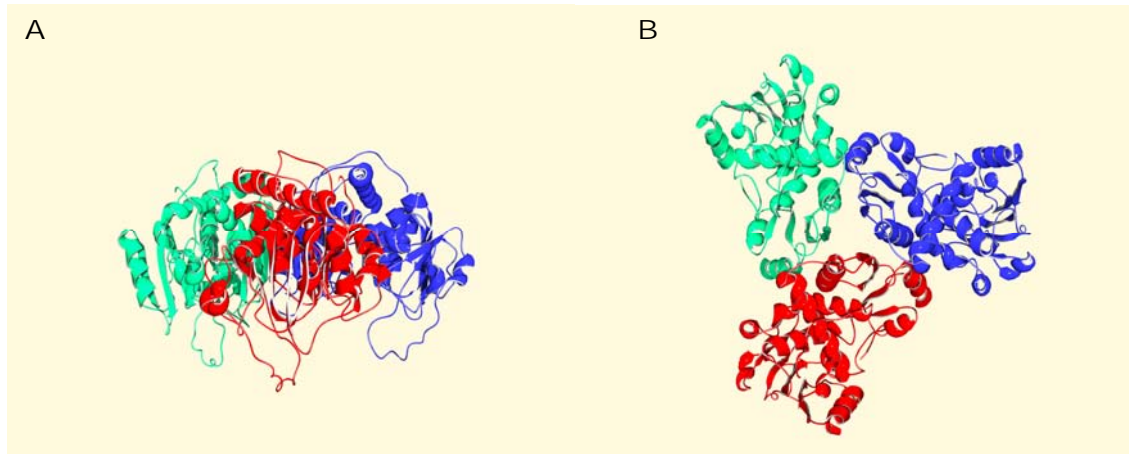
### 2.2.1 Überblick über die Struktur

Die humane OTC ist ein Homotrimer bestehend aus exakt 3 symmetrischen Monomeren mit je einem aktiven Zentrum (Bild 1-3).



**Bild 1-3 Dreidimensionale Darstellung des Monomers der humanen OTC (Peptidrückgrat in Banddarstellung).**

$\alpha$ -Helices sind in rot gezeigt,  $\beta$ -Stränge in blau, pink sind die Helices 1, 5 und 12. Helices 5 und 12 verbinden die CP- und ORN-Domäne. N: N-terminales Ende. C: C-terminales Ende.



**Bild 1-4 Darstellung des Trimers der humanen OTC mit Blickrichtung entlang der dreigefalteten Symmetrieachse in B und Seitenansicht in A.** Das Trimer setzt sich aus drei identischen Untereinheiten zusammen, welche in grün, blau und rot dargestellt sind.

Jede Polypeptidkette bildet zwei strukturelle Domänen: eine CP-(Carbamylphosphat-) Domäne oder polare Domäne und eine ORN-(Ornithin-) Domäne oder auch äquatoriale Domäne genannt (Shi *et al.* 1998). Die Domänen werden durch zwei lange Helices (Helix 5 und 12) verbunden, und jede Domäne besitzt zentral eine parallele  $\beta$ -Faltblattstruktur, die von  $\alpha$ -Helices und Loops (Schleifen) mit  $\alpha/\beta$  Topologie umgeben ist. Die Sekundärstruktur ist in Bild 1-5 dargestellt.



**Bild 1-5 Darstellung der Sekundärstruktur der humanen OTC eines Monomers.** Bei den kursiv hervorgehobenen Buchstaben handelt es sich um konservierte Motive. Die Helices sind mit H (rot) benannt und die  $\beta$ -Faltblätter mit S (blau). "a" wurde zur Beibehaltung der einheitlichen Nummerierung der wesentlichen Helices von unterschiedlichen OTC und ATC eingefügt. (Shi *et al.* 2001)

Das aktive Zentrum ist zwischen zwei Domänen in einer Spalte lokalisiert und wird von den angrenzenden Monomeren geteilt. Die konservierten Motive Ser-Thr-Arg-Thr-Arg (Reste 90-94) und His-Pro-Xaa-Gln (Reste 168-171), welche CP binden, befinden sich am N-terminalen Ende von Helix 2 und Helix 5. Ser<sup>90</sup>, Thr<sup>91</sup>, Arg<sup>92</sup>, Thr<sup>93</sup> und Arg<sup>94</sup> von einer Untereinheit und His<sup>117</sup> von der benachbarten Untereinheit sind in die Bindung der Phosphatgruppe von CP involviert. Gln<sup>171</sup>, Cys<sup>303</sup> und Arg<sup>330</sup> sind an der Interaktion mit Stickstoff von CP beteiligt. Thr<sup>93</sup>, Arg<sup>141</sup> und His<sup>168</sup> sind in die Bindung an Carbonyl-Sauerstoff involviert (Shi *et al.* 2001).

Die hochkonservierte Aminosäure Lys<sup>88</sup>, deren Konformation durch die Interaktion mit dem Aminosäurerest Asp<sup>165</sup> aufrechterhalten wird, scheint eine Schlüsselrolle beim Binden des zweiten Substrates zu spielen. Eine chemische Modifikation dieser Aminosäure führt zu einem kompletten Verlust der Enzymaktivität (Valentini *et al.* 1996). Drei Wassermoleküle, Wasser-359, Wasser-460 und Wasser-439, sind nur in der Binärstruktur, dem OTC-CP-Komplex, gefunden worden. Diese Wassermoleküle sind wichtig zur Erhaltung der Konformation der Seitenketten der Aminosäuren Asn<sup>199</sup> und Asp<sup>263</sup>, um das zweite Substrat zu binden. Die Position von Wasser-460 scheint auch eine ideale Bindungsstelle für Metall-Ionen wie Zn(II) oder Cd(II) zu sein. Zn(II) oder Cd(II)-Ionen können fest an die OTC binden (Kuo *et al.* 1990 und Aoki *et al.* 1988). Die Struktur des Binärkomplexes liefert eine potentielle Metall-Bindungsstelle. Beteiligte Strukturen sind die Seitenketten von Cys<sup>303</sup> und zwei Wassermoleküle, welche in Gegenwart von CP mit dem Phosphat-Sauerstoff von CP, dem Carbonyl-Sauerstoff von Leu<sup>304</sup>, den Seitenketten der Aminosäuren Asp<sup>263</sup> und Asn<sup>199</sup> und anderen Wassermolekülen interagieren. Das N<sup>ε2</sup>-Atom von His<sup>168</sup> bildet eine starke Wasserstoffbrückenbindung mit dem Carbonyl-Sauerstoff von CP, so dass die Seitenkette von His<sup>168</sup> als Ligand nicht zur Verfügung steht und die Zn(II)-Bindung nur schwach ist. Die Seitenkette von His<sup>168</sup> kann in Abwesenheit von CP Zn(II) durch einen leichten Konformationswechsel binden. Die starken Interaktionen zwischen Zn(II) und den Aminosäureresten der zwei Domänen bewirken eine Enzymisomerisation (Shi *et al.* 2001).



### 2.2.2 Wechselwirkungen der Untereinheiten

Die Wechselwirkungen der Untereinheiten gehen hauptsächlich von zwei Regionen aus: Aminosäuren 89-99 und Aminosäuren 113-134. Reste von Aminosäuren dieser Regionen sind auch in die Bindung der Phosphatgruppe von CP involviert. Die Wechselwirkungen zwischen Arg<sup>92</sup> und Glu<sup>122</sup> sowie zwischen Arg<sup>94</sup> und Phe<sup>110</sup> sind in allen OTCasen und ATCasen konserviert und möglicherweise zur Aufrechterhaltung der Trimerstruktur und der katalytischen Aktivität von Bedeutung (Allewell *et al.* 1999). Obwohl die Aminosäure 91 sowohl Glycin, Methionin als auch Leucin sein kann, scheinen die Wechselwirkungen zwischen O<sup>γ</sup><sup>1</sup> von Thr<sup>91</sup> und dem Rückgrat N von His<sup>117</sup> funktionelle Bedeutung im Hinblick auf die Substrataffinität von CP zu haben (Shi *et al.* 2001).

### 2.2.3 Substraterkennung

Das konservierte Ser<sup>90</sup>-Thr<sup>91</sup>-Arg<sup>92</sup>-Thr<sup>93</sup>-Arg<sup>94</sup>-Motiv der humanen OTC gilt als Bindungsstelle für CP. Die spezifische räumliche Anordnung der Aminosäurereste sowie das positiv geladene Arginin zusammen mit den Dipolwechselwirkungen der Helix 2, stellen eine ideale Bindungsstelle der negativ geladenen Phosphatgruppe von CP dar. Obwohl Thr<sup>91</sup> und Arg<sup>94</sup> nicht direkt an der Bindung von Carbamylphosphat beteiligt sind, kommt diesen beiden Aminosäuren eine funktionelle Bedeutung zu. Die Seitenkette von Thr<sup>91</sup> interagiert mit His<sup>117</sup> von der angrenzenden Untereinheit, und diese Wechselwirkung ist von großer Bedeutung für die Bindung von CP. Eine ähnliche Rolle scheint die Interaktion der Seitenkette der Aminosäure Arg<sup>94</sup> mit dem Carbonyl-Sauerstoff der Aminosäure Phe<sup>110</sup> von der benachbarten Untereinheit zu haben (Shi *et al.* 2001).

Das zweite konservierte Motiv der humanen OTC, His<sup>168</sup>-Pro<sup>169</sup>-Xaa<sup>170</sup>-Gln<sup>171</sup>, ist in die Bindung der Carbamylgruppe von CP involviert. Die absolute Konservierung dieses Motivs in der Familie der Transcarbamylasen weist auf eine essentielle Rolle für die Enzymfunktion hin (Shi *et al.* 2001).

Das konservierte His<sup>302</sup>-Cys<sup>303</sup>-Leu<sup>304</sup>-Pro<sup>305</sup>-Motiv in der humanen OTC ist Teil der L-Ornithin-Bindungsstelle (Kuo *et al.* 1990 u. Kraus *et al.* 1985). Es wurde mit Hilfe von Mutationen und chemischer Modifikation gezeigt, dass Cys<sup>303</sup> essentiell für die Bindung des zweiten Substrates ist (Kuo *et al.* 1990; McDowall *et al.* 1990; Marshall *et al.* 1980). Die Kristallstruktur liefert dafür nicht den direkten Beweis, aber das N<sup>ε</sup>-Atom von L-Ornithin kann mit dem S<sup>γ</sup>-Atom von Cys<sup>303</sup> interagieren (Shi *et al.* 2000).

Die derzeitige Kristallstruktur zeigt das konservierte Motiv Asp<sup>263</sup>-Xaa<sup>264</sup>-Xaa<sup>265</sup>-Xaa<sup>266</sup>-Ser<sup>267</sup>-Met<sup>268</sup>-Gly<sup>269</sup> des flexiblen SMG-Loops der humanen OTC als Hauptbindungsstelle für L-Ornithin. Es handelt sich dabei um eine sogenannte induzierte Bindungstasche. Durch Bindung des zweiten Substrates wird eine Konformationsänderung bewirkt, welche die flexible Schleife in das aktive Zentrum bringt (Shi *et al.* 2001).

Kinetische Studien lassen ein geordnetes Binden und Dissoziieren der Substrate an die OTC erkennen. Zuerst bindet CP, dann L-Ornithin, Citrullin dissoziiert zuerst und Phosphat zuletzt (Goldsmith *et al.* 1993 u. Porter *et al.* 1969).

Die Struktur des Binärkomplexes liefert eine klare Erklärung dafür. CP bindet in einer tiefen Tasche und im Tertiärkomplex; d.h. nach zusätzlicher Bindung von L-Ornithin ist CP komplett durch das zweite Substrat und den SMG-Loop verdeckt (Shi *et al.* 2000). Die Bindungsstelle für CP ist zugänglicher in der Binärstruktur, da sich der SMG-Loop abseits des aktiven Zentrums befindet. Dies lässt klar erkennen, dass CP zuerst binden muss, bevor das aktive Zentrum durch Binden des zweiten Substrates verschlossen wird (Shi *et al.* 2001).

### 3 Struktur des OTC-Gens

Das humane *OTC*-Gen wurde bereits in den 80er Jahren auf dem kurzen Arm des X-Chromosoms (Xp21.1) lokalisiert (Lindgren *et al.* 1984), geklont und sequenziert (Horwich *et al.*, 1984; Hata *et al.*, 1988). Es unterliegt der X-Chromosom-Inaktivierung bei Frauen, was schon früh mittels in situ Enzymassays in der Leber von heterozygoten Frauen mit OTC-Mangel nachgewiesen wurde (Ricciuti *et al.* 1976).

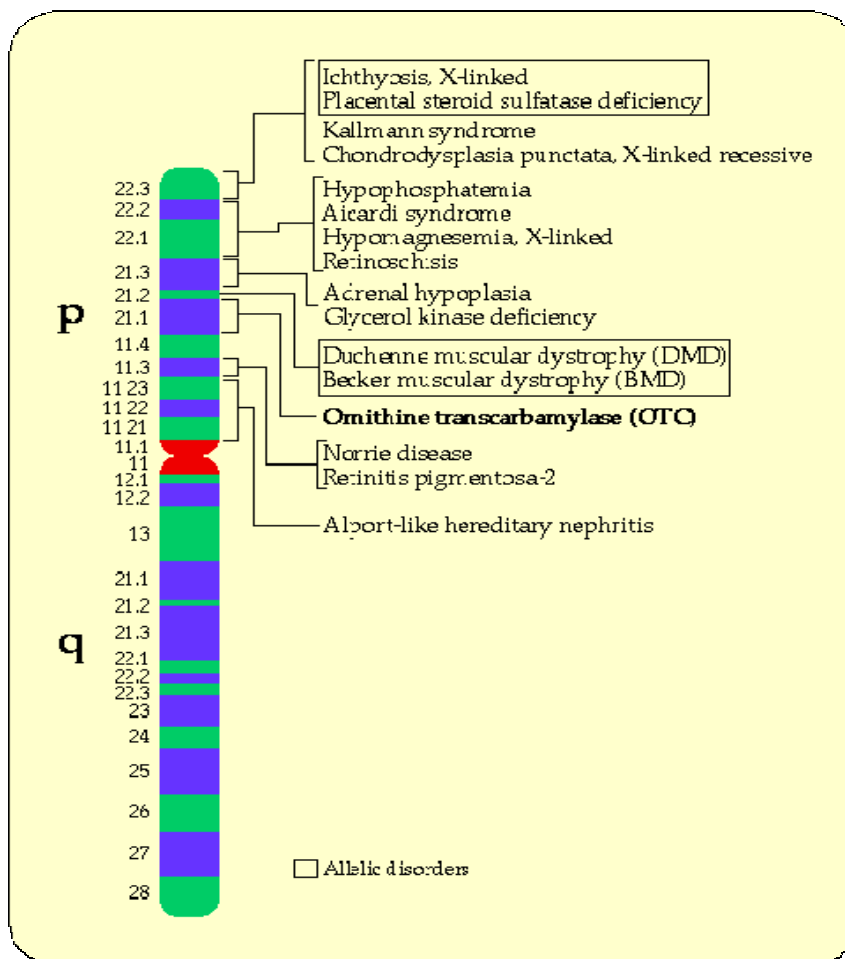
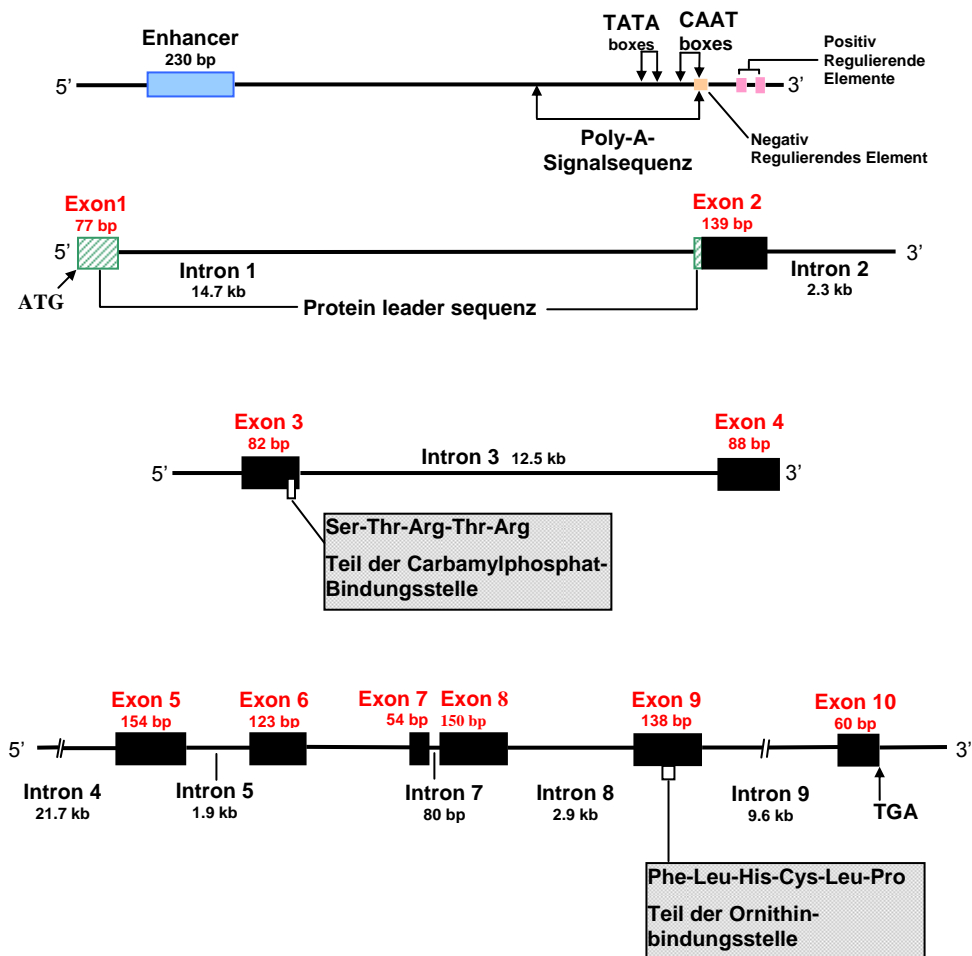


Bild 1-6 X-Chromosom mit Darstellung der Lokalisation des *OTC*-Gens und angrenzender Abschnitte.

Das *OTC*-Gen ist 73 kb groß, enthält 10 Exons und 9 Introns. Exon 5 ist mit 154 bp das größte Exon, während Exon 7 mit 54 bp das kleinste Exon ist. Das längste Intron, Intron 4, enthält 21.7 kb und das kürzeste ist Intron 7 mit 80 bp. Alle Exon /Intron Grenzen stimmen mit der GT-AG-Regel überein: die Introns beginnen mit GT als Spleißdonorstelle und enden mit AG als Spleißakzeptorstelle.



**Bild 1-7 Schematische Darstellung des *OTC*-Gens** Das erste Exon beginnt mit dem Triplet ATG (Startcodon) und Exon 10 endet mit dem Stopcodon TGA.



**Bild 1-8 Darstellung der genomischen Nukleotidsequenz des humanen *OTC*-Gens einschließlich der 5'- und 3'-Region und der Intron-Exon Grenzen.** Position +1 entspricht dem ersten Nukleotid des Startcodon. Die Nukleotide vom Startcodon aufwärts sind negativ nummeriert. Die 10 Exons sind grau unterlegt. Das vollständige Gen umfasst 73kb. (Hata *et al.* 1988; Matsuura *et al.* 1993)

Die OTC mRNA kodiert für das Precursor OTC-Protein, bestehend aus 354 Aminosäuren einschließlich der Signalsequenz (Brusilow u. Horwich 1995). Wie die meisten mitochondrialen Proteine wird es im Zellkern kodiert und in den Matrixraum der Mitochondrien transloziert. Die Zielsteuerung in die mitochondriale Matrix erfolgt durch eine aminoterminal lokalisierte Signalsequenz aus 32 Aminosäuren, von denen einige basisch sind und eine sauer ist. Horwich et al. haben gezeigt, dass das Leaderpeptid der humanen Pre-OTC ausreichend Information enthält, um das Protein in das Mitochondrium zu importieren (Horwich *et al.* 1985a). Der mittlere Abschnitt dieser Sequenz, besonders der Argininrest in Position 23, ist essentiell für die Bindung an die mitochondriale Membran, die Aufnahme in die mitochondriale Matrix und die mitochondriale Umformung zur nativen OTC. Die Bedeutung wurde anhand von Einzelbasen Substitutionen untersucht. Die Substitution von Arginin an der Position 23 durch Glycin ergab bei Analyse des Vorläuferproteins einen kompletten Funktionsverlust. Dies könnte durch eine Partizipation in eine lokale Sekundärstruktur, möglicherweise eine  $\alpha$ -Helix, zustande kommen (Horwich *et al.* 1985b und 1986).

Das erste Exon enthält sowohl beim humanen als auch beim murinen OTC-Gen die ersten 26 Codons des Signalpeptides. Es wird diskutiert, dass diese für den Transport des Proteins in das Mitochondrium essentielle Region der Presequenz aus einer Genfusion während der Evolution hervorgegangen ist und die Ornithintranscarbamylase dadurch das Signal für die mitochondriale Lokalisation erhielt (Hata *et al.* 1986). Der Import schließt eine Reihe von molekularen Interaktionen ein. Da nur entfaltete Matrixproteine in das Mitochondrium transloziert werden können, wird das Protein durch Assoziation an das cytosolische Chaperon Hsp70 in einem partiell entfaltenen Zustand gehalten. Die überwiegend positiv geladene Signalsequenz wird durch einen Rezeptorkomplex in der äußeren Mitochondrienmembran erkannt und durch die Membranen transloziert. In einem energieabhängigen Prozeß bindet die Signalsequenz an das mitochondriale Hsp70. In zwei aufeinander folgenden Schritten wird im Matrixraum des Mitochondriums das Signalpeptid durch Peptidasen abgespalten. Die Faltung und Zusammensetzung zur nativen Form wird durch einen Hsp60-Komplex in Kooperation mit einer Hsp10 Komponente gewährleistet (Brusilow u. Horwich 1995).

## C Klinische und molekulare Grundlagen

### 1 Erbliche Harnstoffzyklusdefekte

Die Hauptaufgabe des Harnstoffzyklus ist die Bildung von Harnstoff als unschädliches Stickstoffausscheidungsprodukt. Ist die Aktivität dieses Stoffwechselweges eingeschränkt, resultiert eine Akkumulation von Stickstoff in Form des neurotoxischen Ammoniaks in Blut und Gewebe.

Für jedes der im Harnstoffzyklus beteiligten Enzyme sind erbliche Defekte bekannt. Die entsprechenden Krankheiten sind der N-Acetylglutamat-Synthetase (NAGS-) Mangel, der Carbamylphosphat-Synthetase I (CPS I-) Mangel, der Ornithintranscarbamylase (OTC-) Mangel, die Citrullinämie Typ I oder Argininosuccinat-Synthetase (ASS-) Mangel, die Argininbernsteinsäure-Krankheit oder Argininsuccinat-Lyase (ASL-) Mangel und die Hyperargininämie bzw. der Arginase Mangel. Harnstoffzyklusdefekte gehören zu den häufigsten Stoffwechselerkrankungen mit einer kumulativen Inzidenz von ca. 1:8000 Neugeborenen. Am häufigsten kommt mit 1:14.000 der X-chromosomal vererbte OTC-Mangel vor; die anderen, autosomal-rezessiv vererbten Krankheiten treten mit einer Frequenz von etwa 1:60.000 auf und die Hyperargininämie nur mit 1:350.000 (AWMF-Leitlinien-Kindliche Stoffwechselkrankheiten).

**Tabelle I-2 Erbliche Harnstoffzyklusdefekte.**

NAGS Mangel: N-Acetylglutamat-Synthetase Mangel.

HHH Syndrom: Hyperammonämie-Hyperornithinämie-Homocitrullinurie Syndrom oder Ornithin Translocase Mangel

Erkrankung	Gen	Chromosom	Vererbung
NAGS Mangel	<i>NAGS</i>	17q21.3	autosomal-rezessiv
Carbamylphosphat Synthetase I Mangel	<i>CPS I</i>	2q35	autosomal-rezessiv
Ornithintrans-carbamylase Mangel	<i>OTC</i>	Xp21.1	X-Chromosomal
Citrullinämie Typ I	<i>ASS</i>	9q34	autosomal-rezessiv
Argininosuccinat-acidurie	<i>ASL</i>	7cen-q11.2	autosomal-rezessiv
Arginase Mangel	<i>ARG1</i>	6q23	autosomal-rezessiv
HHH Syndrom	<i>SLC25A15</i>	13q14	autosomal-rezessiv

Weitere genetische Defekte der Ammoniakentgiftung sind beispielsweise die Citrullinämie Typ II (Citrinmangel durch Defekt des mitochondrialen Asp-Glu-Transporters), die Lysinurische Proteinintoleranz durch eine Transportstörung dibasischer Aminosäuren sowie das autosomal-dominant erbliche Hyperinsulinismus-Hyperammonämie Syndrom und die Hypoprolinämie (Ornithinstoffwechselstörung).

### 1.1 Klinisches Bild

Ammoniak ist neurotoxisch und angeborene Störungen des Harnstoffzyklus führen über eine Hyperammonämie zu schweren neurologischen Problemen. Die einzelnen Defekte lassen sich durch spezifische biochemische Befunde abgrenzen.

Definitionsgemäß spricht man von einer Hyperammonämie, wenn Ammoniak ( $\text{NH}_3$ ) im Blut mehr als  $80 \mu\text{mol/l}$  bzw. bei Neugeborenen mehr als  $110 \mu\text{mol/l}$  beträgt. Eindeutig abklärungsbedürftige Hyperammonämien liegen vor, wenn beim Neugeborenen die Ammoniakkonzentration  $>150 \mu\text{mol/l}$  und jenseits des Neugeborenenalters  $>100 \mu\text{mol/l}$  betragen. Patienten mit Störungen im Harnstoffzyklus können in jedem Alter symptomatisch werden, besonders jedoch zu Zeiten eines erhöhten Proteinkatabolismus, wie es zum Beispiel in der Neonatalperiode, im späten Säuglingsalter durch die Umstellung auf proteinreiche Nahrung und dem Beginn einer Periode mit häufigen interkurrenten Infekten sowie in der Pubertät der Fall ist.

Die akute Symptomatik wird durch das Ausmaß der Hyperammonämie bedingt. Beim Neugeborenen treten nach einer kurzen Symptomfreiheit Trinkschwäche und Erbrechen auf. Die neurologische Symptomatik wie eine gesteigerte Irritabilität, Änderungen im Muskeltonus, Ataxie, grobschlägigen Tremor, Krampfanfälle sowie Lethargie und Koma entwickelt sich in dramatischer Weise. Infolge einer Gerinnungsstörung kann es zu einer gefährlichen Hirnblutung kommen. Beim älteren Säugling ist die klinische Symptomatik variabel und oft weniger drastisch als beim Neugeborenen. Zu den schon genannten Symptomen beim Neugeborenen können eine Gedeih- und Entwicklungsstörung sowie Verhaltensauffälligkeiten kommen. Im Kindes- und Erwachsenenalter findet man episodisch auftretende metabolische Enzephalopathien. Die häufigsten Symptome bei solchen hyperammonämischen Episoden sind Inappetenz, Lethargie, Reizbarkeit, Agitiertheit, Verhaltensauffälligkeiten bis hin zu Verwirrtheit, aber auch Erbrechen, migräneartige Kopfschmerzen und Ataxie. Auch eine rasche Verschlechterung der Klinik bis hin zum Koma und Tod ist möglich.



Eine chronische Hyperammonämie bzw. immer wieder auftretende Hyperammonämien führen zur Hirnatrophie und psychomotorischer Retardierung.

Das unterschiedliche Ausmaß und die Schwere der Erkrankungen wird bestimmt von der enzymatischen Restaktivität (als Resultat des Genotyps sowie bei Frauen mit OTC-Mangel dem Muster der X-Inaktivierung), den metabolischen Konsequenzen, die aus den unterschiedlichen Enzymdefekten resultieren sowie externen Faktoren.

Diagnostisch wegweisend sind neben der Bestimmung des Plasma-Ammoniakspiegels und eines allgemeinen Notfallprogrammes (Blutbild und Bestimmung von Elektrolyte, Blutzucker, Leber- und Nierenwerte, Gerinnung, Blutgase, Säure-Basen Status), vor allem die quantitative Bestimmung der Aminosäuren im Plasma und Urin und der organischen Säuren inklusive Orotsäure in einer Spontanurinprobe sowie die Untersuchung des Acylcarnitinprofils im Trockenblut.

Anhand der Ergebnisse der Analyse der Plasma-Aminosäurekonzentration in Kombination mit der Höhe der Orotsäurekonzentration im Urin ist die Festlegung der Position einer Störung im Harnstoffzyklus möglich.

Differentialdiagnostisch sollte man neben Defekten im Harnstoffzyklus als Ursache einer Hyperammonämie, Organoazidopathien und Störungen des Transports von Harnstoffzyklusmetaboliten sowie sekundäre Ursachen wie zum Beispiel Leberfunktionsstörungen und die Transiente Hyperammonämie des Neugeborenen oder das Reye Syndrom in Betracht ziehen.

## 2 Das klinische Bild des OTC-Mangels

Das klinische Bild beim OTC-Mangel ist sehr variabel und reicht von einem akuten neonatalen hyperammonämischen Koma bis zum klinisch asymptomatischen Erwachsenen. Das breite klinische Spektrum ist als Funktion unterschiedlicher Mutationen und daraus resultierender Enzymveränderungen zu sehen. Aber auch andere Faktoren wie die Inaktivierung eines X-Chromosoms bei Frauen können Einfluss auf das klinische Erscheinungsbild nehmen.

Mehr als 80 Prozent der heterozygoten Frauen sind klinisch asymptomatisch. An einem akuten neonatalen hyperammonämischen Koma erkrankte Neugeborene sind fast ausschließlich hemizygot männliche Patienten mit schweren Mutationen und fehlender Enzymaktivität. Bei Patienten mit einem partiellen OTC-Mangel, d.h. Knaben mit Restenzymaktivität bzw. heterozygoten Mädchen, beobachtet man hingegen eine sehr unterschiedliche klinische Ausprägung der Symptome wie auch einen variablen Zeitpunkt der klinischen Manifestation (Tuchman *et al.* 2002).

Eine OTC Enzymaktivität von mehr als 30 Prozent der normalen Enzymaktivität, führt in der Regel erst bei katabolen Stoffwechselsituationen und / oder der Aufnahme zu hoher Nahrungsproteinmengen zu klinischen Symptomen (Finkelstein *et al.* 1990a).

Je nach Beginn der Erkrankung kann man zwischen dem Neonatal-onset Typ und dem Late-onset Typ unterscheiden.

### 2.1 Neonatal-onset Typ

Der Zeitpunkt des Beginns der Erkrankung liegt im Neugeborenenalter. Das scheinbar gesunde Neugeborene erscheint in den ersten 24 Stunden nach der Geburt klinisch unauffällig. Dem geht auch fast immer eine normale Schwangerschaft ohne pränatale und perinatale Risikofaktoren voraus.

Erste Symptome wie Trinkschwäche und Irritabilität werden meist zwischen 24 bis 72 Stunden nach der Geburt, manchmal auch einige Tage später, beobachtet. Die Symptomatik ist progredient, und innerhalb von Stunden entwickeln sich weitere klinische Symptome wie Erbrechen, Tachypnoe, eine zunehmende Lethargie, Hypothermie und Hyperventilation mit einer respiratorischen Alkalose. Die Hyperventilation kann als Symptom einer pulmonalen Erkrankung fehlgedeutet werden.

Ohne Intervention wird das Neugeborene komatös und benötigt eine künstliche Beatmung. Die progrediente Enzephalopathie, die sich klinisch durch Krampfanfälle, Reflexverlust, Lethargie, Stupor bis hin zu Koma und respiratorischer Insuffizienz äußert, entwickelt sich in Abhängigkeit von der Schwere der Hyperammonämie (Maestrie *et al.* 1999). Der entscheidende Laborbefund ist die Hyperammonämie mit erhöhter Konzentration von Orotsäure im Urin. Ein kompletter OTC-Mangel, begleitet von schwerster Hyperammonämie, Hypocitrullinämie und Orotazidurie, führt oft zum schnellen Tod.

## 2.2 Late-onset Typ

Prädilektionszeiten für metabolische Stoffwechselentgleisungen sind das späte Säuglingsalter mit der Umstellung auf proteinreiche Nahrung, die Pubertät mit verändertem Wachstum, sowie bei Frauen die Peripartalzeit. Auch Infektionen, Traumen, operative Eingriffe oder proteinreiche Mahlzeiten können zu einem Stoffwechselstress führen und somit die mögliche Harnstoffsyntheseleistung überschreiten. Episodisch auftretende Hyperammonämien mit unklarer Enzephalopathie sind die Folge.

Das klinische Bild bei Säuglingen und Kindern ist geprägt durch eine Nahrungsverweigerung, Erbrechen und chronisch neurologischen Symptomen, begleitet von einer Gedeihstörung und einem Entwicklungsrückstand. Es treten episodische Enzephalopathien mit Lethargie, Ataxie und zerebralen Anfällen auf.

Bei Jugendlichen und Erwachsenen steht die chronisch neurologische oder psychiatrische Symptomatik im Vordergrund. Migräneartige Kopfschmerzen, Übelkeit und Erbrechen, aber auch Verhaltensauffälligkeiten mit Reizbarkeit, Agitiertheit, Verwirrung, Lethargie und Psychose sowie rezidivierende Enzephalopathien im Zusammenhang mit einer ungewöhnlich hohen Proteinzufuhr oder einer katabolen Stoffwechselsituation sollten differentialdiagnostisch an einen OTC-Mangel denken lassen.

Besonders dramatisch ist die akute Eintrübung mit Entwicklung eines Hirnödems, das trotz dann optimaler Therapie innerhalb weniger Tage zum Tode führen kann. In vielen Familien wird das Vorkommen eines OTC-Mangels erst nach dem plötzlichen Tod eines heterozygoten Mädchens bzw. Frau erkannt.

### 3 Molekulare Basis des OTC-Mangels

Derzeit sind 341 Mutationen sowie 29 nicht pathogene Mutationen und Polymorphismen im *OTC*-Gen beschrieben (Yamaguchi *et al.* 2006). Die Mutationen sind relativ gleichmäßig über alle Exons und angrenzenden Introns verteilt, mit Ausnahme von Exon 1 und Exon 7. Die meisten der Mutationen sind für eine Familie spezifisch. Man spricht deshalb auch von so genannten „privaten“ Mutationen. Gut 40 Prozent der Mutationen sind mit einer neonatalen Manifestation (innerhalb der ersten Lebenswoche) des OTC-Mangels assoziiert, ca. 20 Prozent der Mutationen wurden bei Knaben mit Late-onset-Manifestation und knapp 40 Prozent bei heterozygoten Frauen nachgewiesen (Yamaguchi *et al.* 2006). Bei ca. 84 Prozent der Mutationen handelt es sich um Punktmutationen. Kleine Deletionen sowie Insertionen nehmen mit ca. 12% und große Deletionen mit 4% einen eher geringen Anteil ein (Yamaguchi *et al.* 2006).

Ungefähr 13 Prozent der Mutationen betreffen die Splice-Site-Regionen im *OTC*-Gen und sind in der Regel mit einer neonatalen Manifestation assoziiert. Es gibt 18 CpG-Dinukleotide in der kodierenden Sequenz des *OTC*-Gens und ungefähr ein Drittel aller Basensubstitutionen betreffen diese hot-spots (Tuchman *et al.* 2002). CpG-Dinukleotid bedeutet, dass Cytosin über eine 3'-5'-Phosphodiesterbindung mit Guanin gekoppelt ist. Die Cytosinreste in den CpG-Dinukleotiden werden häufig am Kohlenstoffatom 5 methyliert und aus dem entstandenen 5-Methylcytosin kann durch Desaminierung spontan Uracil entstehen. Die häufigsten Substitutionen im *OTC*-Gen sind dementsprechend C nach T-Transitionen bzw. G nach A Transitionen (Desamination auf dem nicht-codogenen Strang).

Weniger als 5 Prozent der Mutationen im *OTC*-Gen treten gehäuft bzw. wiederholt auf und sind gleichmäßig auf die CpG-Dinukleotide verteilt (Tuchman *et al.* 1998). Die Tatsache, dass G nach A-Transitionen im *OTC*-Gen 1,6fach mehr beobachtet werden als C nach T-Transitionen, ist schlecht verstanden, könnte aber mit einem vermehrten Auftreten von methylierungsabhängiger Desamination im nicht-codogenen DNA-Strang in Zusammenhang stehen (Wu and Maeda 1987).

Mit der Entdeckung der Tertiärstruktur der humanen OTC, einschließlich des aktiven Zentrums und Interaktionen zwischen den Monomeren des Trimers, konnten Auswirkungen von Aminosäuresubstitutionen modellhaft analysiert werden (Shi *et al.* 1998, 2001).

Mutationen, welche durch Aminosäuresubstitutionen im Bereich des aktiven Zentrums entstehen, stehen mit der neonatalen Manifestation des OTC-Mangels in Zusammenhang. Dazu gehören beispielsweise: R92Q, T93A, R141Q, D196V, D263N, R277W/R277Q, C303Y (Shi *et al.* 1998). Mutationen, welche bei Late-onset Formen des OTC-Mangels zu finden sind, können zum einen die Affinität des Enzyms für des Substrat Ornithin beeinflussen (zum Beispiel R277W und R277Q) (Morizono *et al.* 1997). Zum anderen gibt es Mutationen, die Auswirkungen auf die Stabilität des Enzyms haben können, woraus eine verkürzte Halbwertszeit resultiert (zum Beispiel R40H, E52D, P225T) (Mavinakere *et al.* 2001).

Die folgende Tabelle I-3 aus der Arbeit von McCullough *et al.* 2000, gibt einen Überblick über die Mutationen in Bezug auf den Phänotyp und gemessene Enzymaktivitäten. Die in der Tabelle nicht enthaltenen Deletionen und Insertionen sind meist mit der neonatalen Verlaufsform vergesellschaftet.

**Tabelle I-3 Phänotyp-Klassifikation der Mutationen im OTC-Gen (McCullough *et al.* 2000)**

Hemizygoten Männer					
Neonatal-Onset <sup>a</sup>		Late-Onset <sup>b</sup>		Heterozygote Frauen <sup>c</sup>	
R23X	G195R (0%)	R40H (6%)	R277W (5%)	IVS1nt+1g>a	IVS7nt+2t>c
R26Q (0%)	M206R	G50R	R277Q	N47I	D263N
E52K	A209V	E52D (4%)	H302Q	E52X	D263G
IVS2nt-1g>a	IVS6nt+2t>c	M56T	L304F	S60L	C303Y
G79E (0%)	P225L (0%)	L77F	309ΔGAA	82ΔCTT	V315G
G83R	T247K (0%)	K88N (3%)	F354C	L82X	V315D
S90N	H255P	T93A		S90R	F316S
R92Q (0%)	Q270X	R94T		L95S	T343K
R92X	Q279X	H117L		G106R	Y345D
A102E (0%)	K289N (0%)	R129H		L139S	
IVS4nt-2a>c	IVS8nt+1g>a	I159T (1.5%)		R141P	
IVS4nt-2a>g	E310X	H168Q		K144X	
R141Q (0%)	R320X	Q180H		L148W	
R141X	R320L	H202Y		A174P	
N161S (0%)	R330G	A208T (4%)		G197E	
T178M	W332X	P225T		S203C	
E181G	IVS9nt+1g>t	T247K		IVS6nt+1g>a	
H182L	Y345C	S267R		IVS6nt+3Δg	
Y183C (0%)		272ΔGGA (27%)		E239E splice*	

Die gemessenen Enzymaktivitäten in Prozent, sind in Klammern als Restenzymaktivität angegeben.

<sup>a</sup>Männliche Patienten, welche innerhalb der ersten Lebenswoche nach der Geburt an einem akuten hyperammonämischen Koma erkranken.

<sup>b</sup>Männliche Patienten, welche nach der ersten Lebenswoche an OTC-Mangel erkranken.

<sup>c</sup>Weibliche Patienten, die an OTC-Mangel erkrankt sind, sind meist Träger von Mutationen des Neonatal-onset Typs.

Wie aus der Tabelle I-3 hervorgeht, wurden Mutationen bei klinisch symptomatischen weiblichen Patientinnen in der Regel nicht bei männlichen Patienten mit Late-onset Form der Erkrankung nachgewiesen. Daraus lässt sich ableiten, dass heterozygote weibliche Patientinnen mit manifestem OTC-Mangel mit großer Wahrscheinlichkeit Neonatal-onset Typ Mutationen tragen.

Es wurde gezeigt, dass ungefähr 80 Prozent der Mutationen bei männlichen Patienten vererbt worden sind und es sich nur in 20 Prozent der Mutationen um Spontanmutationen handelt, während bei weiblichen Patienten ein umgekehrtes Verhältnis vorliegt. Die Mutationsrate im *OTC*-Gen ist in männlichen Keimzellen höher als in weiblichen Keimzellen. Aus den bisherigen Veröffentlichungen gehen keine Daten zur Häufigkeit eines männlichen Keimzellmosaik für OTC-Mutationen hervor. Die Wahrscheinlichkeit, dass die Mutter einer betroffenen Tochter Überträgerin des OTC-Mangels ist, wird als eher niedrig eingeschätzt (Tuchman *et al.*1995a; McCullough *et al.*2000).

## 4 Diagnose

Der Zeitpunkt der Diagnosestellung und der rasche Beginn einer effizienten Behandlung sind entscheidend für die Vermeidung schwerer Hirnschäden und damit für die Prognose des OTC-Mangels. Das Auftreten einer Hyperammonämie bei unklarer Enzephalopathie verlangt ein abgestuftes differenzialdiagnostisches Vorgehen. Eine rasche Primärdiagnostik ist unbedingt notwendig, um eine gezielte Akuttherapie einleiten zu können. Der Bestätigungsdiagnostik kommt große Bedeutung für das weitere therapeutische Vorgehen sowie eine humangenetische Beratung zu.

### 4.1 Biochemische Untersuchungen

Der entscheidende Labortest ist die Bestimmung der Ammoniak-Konzentration im Plasma, die beim Neugeborenen normalerweise  $< 110 \mu\text{mol/l}$  beträgt.

Beim OTC-Mangel findet sich neben einer z.T. massiven Hyperammonämie in der Regel eine starke Erhöhung der Orotsäureausscheidung, da das im Mitochondrium akkumulierte Carbamylphosphat in die cytosolische Pyrimidinsynthese einfließt (siehe Bild 1-9 zur Erklärung der Beziehung zwischen intramitochondrialen und cytosolischen Carbamylphosphat und Pyrimidinbiosynthese).

Zusammenfassend würde man beim OTC-Mangel folgende Befundkonstellation der Aminosäuren im Plasma erwarten: Glutamin  $\uparrow$ ; Citrullin  $\downarrow$ ; Orotsäure/Uracil im Urin:  $\uparrow\uparrow$ .

### 4.2 Bestimmung der Enzymaktivität

Eine Bestimmung der Ornithintranscarbamylase-Aktivität aus biopsiertem Leber- oder Darmgewebe kann für eine Bestätigung der Diagnose notwendig sein. Die neonatale Manifestation des OTC-Mangels korreliert mit einer nichtdetektierbaren OTC-Aktivität (Tuchman *et al.* 1989). Die Bestimmung der hepatischen OTC-Aktivität bei erkrankten Frauen, ergab eine deutliche Varianz in unterschiedlichen Biopsieproben. Beispielsweise wurde bei einer an OTC-Mangel erkrankten Frau, welche während einer hyperammonämischen Episode verstarb, in 10 biopsierten Proben (Durchschnittsgewicht 16.8 mg) eine hepatische OTC-Aktivität von 3.1-16.1 Prozent der normalen Aktivität gemessen.

In einem ähnlichen Fall ergab die Bestimmung der hepatischen OTC-Aktivität in 10 biopsierten Proben (Durchschnittsgewicht 12.7 mg), Werte von 4.8 bis 27 Prozent der normalen Aktivität. Daraus lässt sich ableiten, dass entsprechend niedrig gemessene OTC-Aktivitäten diagnostisch eindeutig sind, jedoch höher gemessene Enzymaktivitäten im Einzelfall mehrdeutig sein könnten (Brusilow und Horwich 1995). Ein Überträgerstatus für eine schwere OTC-Mutation bei einer heterozygoten Frau lässt sich durch eine Leberbiopsie jedoch weitgehend ausschließen.

Bei einem Jungen, der mit 10 Jahren an den Folgen eines hyperammonämischen Komas verstarb, wurde eine OTC-Restenzymaktivität von 4 Prozent gemessen, während bei seinem Onkel, der bis dahin keine ernsten Erkrankungen gehabt hatte, auch nur eine Enzymaktivität von 6 Prozent gemessen wurde. Ebenso sei der 97jährige Ur-Großvater des Jungen immer gesund gewesen. Wie die darauf folgende Mutationsanalyse ergab, waren alle drei Personen Träger der Mutation A208T im Exon 6 des *OTC*-Gens. Offensichtlich handelte es sich um eine „milde“ Mutation, die wegen der (wenn auch geringen) Restaktivität nur bei Stoffwechselbelastungen zur schweren Hyperammonämie führte (Ausems *et al.* 1997).

### 4.3 Familienanamnese

Zu erfragen sind, ob in mütterlichen oder väterlichen Familie Erbkrankheiten bekannt sind, unklare Todesfälle Neugeborener aufgetreten sind oder unklare Erkrankungsbilder in der Familie vorkommen. Eine gute Stammbaumanalyse (ggf. mehrere im Neugeborenenalter verstorbenen männlichen Patienten) ist bei der Diagnosefindung eine Hilfe. Als obligat heterozygot kann eine Frau mittels Stammbaumanalyse identifiziert werden, wenn sie ein oder mehr Kinder mit OTC-Mangel geboren hat und ein weiterer Fall von OTC-Mangel in der Familie vorliegt.

### 4.4 Diagnosesicherung

Zur Bestätigung der Diagnose „OTC-Mangel“ wäre die Bestimmung der Enzymaktivität am besten geeignet, da es sich um eine Methode mit der höchsten Sensitivität und Spezifität handelt und eine Aussage hinsichtlich der Restenzymaktivität getroffen werden kann. Da es sich dabei jedoch um eine invasive Diagnostik handelt, gibt man heute der nicht-invasiven molekulargenetischen Diagnostik zunächst den Vortritt.



Die Mutationsanalyse genomischer DNA ist auch für Familienanalysen und die Pränataldiagnostik optimal geeignet. Aber der Mutationsnachweis gelingt nur in etwa 80% der Fälle mit enzymatisch gesichertem OTC-Mangel. Bei fehlendem Mutationsnachweis kann eine zusätzliche Enzymaktivitätsbestimmung notwendig sein. Zur Mutationsanalyse können verschiedene Nachweisverfahren herangezogen werden. Als Untersuchungsmaterial kann genomische DNA oder cDNA verwendet werden. Diese kann z.B. aus Blut, Guthrie-Testkarten, Fibroblasten oder Biopsiematerial gewonnen werden. Für die pränatale Diagnostik wird fetale DNA aus Chorionzottenbiopsien oder Amnionzellen verwendet.

Das Vorkommen von vielen Neumutationen sowie so genannten „privaten“ oder familiären Mutationen und die Tatsache, dass nicht ein gehäuftes Vorkommen bestimmter Mutationen beobachtet wird, gestaltet die Mutationsanalyse schwierig.

Die Analyse der genomischen DNA des *OTC*-Gens basiert in der Regel auf der Amplifikation der 10 Exons einschließlich Exon-Intron-Grenzen mittels PCR, gefolgt von einer Screeningmethode zur Detektion von DNA-Veränderungen oder direkter Sequenzanalyse der gesamten kodierenden Region des *OTC*-Gens (Tuchman *et al.* 2002).

Durch die automatisierten Fluoreszenz-Sequenzierer wurde in den letzten Jahren die direkte Sequenzanalyse als primäre Methode zur Mutationsanalyse attraktiv. Durch eine vorausgehende Screeningmethode kann die zu sequenzierende Probenanzahl und damit der Kosten- und Auswertungsaufwand jedoch reduziert werden. Dazu wurde überwiegend die Analyse von Einzelstrang-Konformationspolymorphismen (SSCP=Single Strand Conformational Polymorphism) beschrieben. Die DGGE-Analyse (Denaturierungs-Gradienten-Gelelektrophorese) erschien uns als kosteneffiziente Screeningmethode des *OTC*-Gens aufgrund der hohen Sensitivität sowie der relativ geringen Anzahl von Exons (insgesamt 10) und deren Größe eine günstigere Alternative, wie bereits auch in einer Publikation von Finkelstein *et al.* für Exon 7 u. 8 beschrieben (Finkelstein *et al.* 1990b).

Ist die krankheitsverursachende Mutation in der Familie bekannt, kann ggf. auch mittels Restriktionsendonukleasen die Analyse durchgeführt werden (Tuchman *et al.* 2002).

Wird durch die direkte Mutationsanalyse die zugrunde liegende Mutation nicht nachgewiesen, stellt die Kopplungsanalyse eine Alternative dar. Dabei kann in Familien, in denen eine Krankheit gehäuft vorkommt, das mutationstragende Allel bestimmt werden. Als besonders wertvolle Marker im *OTC*-Gen gelten die intragenischen Polymorphismen Lys46Arg, IVS3-39\_40insT, IVS3-8A>T, Gln270Arg und IVS4-7A>G (Climent and Rubio 2002).

Die Untersuchung des pathogenen Effektes einer Mutation ist optimalerweise durch Expressionsstudien möglich. Andere Kriterien zur Festlegung, inwiefern eine Mutation den Phänotyp modifiziert oder nicht, sind der Mutationstyp, der zu erwartende Effekt eines Aminosäureaustausches, die Prävalenz einer Mutation, Segregationsanalysen sowie die Berücksichtigung des Umfangs der molekulargenetischen Diagnostik (Cotton and Scriver 1998).

#### 4.5 Heterozygotendiagnostik

Eine Diagnosestellung bei weiblichen Patientinnen mit partiellem OTC-Mangel ist zum Teil sehr schwierig. Die meisten heterozygoten Patientinnen für OTC-Mangel sind asymptomatisch aber tragen ein Risiko für eine hyperammonämische Enzephalopathie mit schwerwiegenden Folgen. Eine gewissenhafte Anamneseerhebung inklusive Familienanamnese und Befragung zu Ernährungsgewohnheiten, das episodische Vorkommen von unspezifischen Symptomen mit Charakterisierung möglicher Zusammenhänge zwischen Beginn der Symptome und Ernährung, können manchmal wichtige Hinweise geben (Rowe *et al.* 1986).

Biochemische Auffälligkeiten sind bei weiblichen Überträgerinnen häufig inkonstant. Als wegweisender Hinweis kann ein auffälliger Allopurinoltest dienen. Dabei handelt es sich um eine indirekte biochemische Methode, welche sicher, schnell und nicht-invasiv ist. Durch unterschiedliche Faktoren sind sowohl falsch-negative als auch falsch-positive Ergebnisse möglich, wodurch die Interpretation des Testes erschwert wird (siehe unten). Bei schwangeren Frauen ist der Allopurinoltest nicht anwendbar, was als Nachteil für die Abklärung einer möglichen Heterozygotie bei einer schon eingetretenen Schwangerschaft zu werten ist. Bei Late-onset Formen des OTC-Mangels wird von der Durchführung eines Allopurinoltestes aufgrund der Möglichkeit falsch-negativer Ergebnisse abgeraten (Grünewald *et al.* 2004).

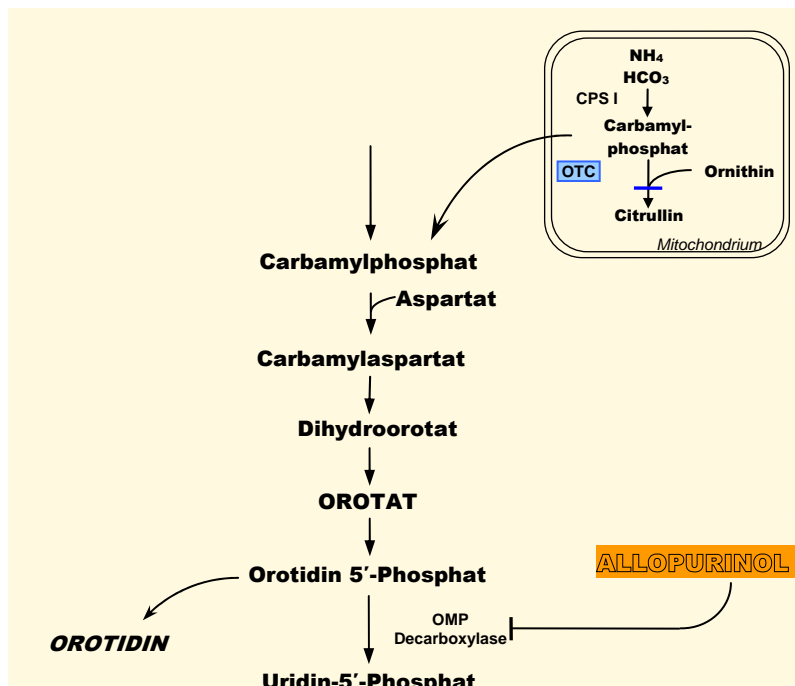
Mit der Mutationsanalyse als direktem, ebenfalls nicht-invasivem Nachweisverfahren erreicht man eine Sensitivität von ca. 80%, so dass bei dringendem V.a. heterozygoten OTC-Mangel und fehlendem Mutationsnachweis die Enzymaktivitätsbestimmung als ultima ratio bleibt.

Yudkoff et al. (1996) entwickelte eine neue Methode zur Kontrolle des Stoffwechsels bei weiblichen Patienten mit OTC-Mangel durch Messung der Ureagenese *in vivo*. Bei klinisch asymptomatischen Überträgern ist eine normale Harnstoffbildung zu beobachten, ihr Stickstoffmetabolismus ist trotzdem nicht normal, zu sehen an einer Zunahme von [5-<sup>15</sup>N]Glutamin. Bei klinisch symptomatischen Heterozygoten war die Harnstoffbildung hingegen signifikant unter der Normalen. Nach einer oralen Gabe des stabilen Isotops <sup>15</sup>NH<sub>4</sub>Cl bestimmt man mittels GC-MS die Konversion von <sup>15</sup>NH<sub>4</sub>Cl zu [<sup>15</sup>N]Harnstoff und [5-<sup>15</sup>N]Glutamin. Sie kamen zu dem Schluss, dass diese Methode hilfreich zur Bewertung der Effizienz interventioneller Therapien wie beispielsweise eine Lebertransplantation oder Gentherapie, sein könnte.

#### 4.5.1 Allopurinoltest

Die Durchführung eines Allopurinoltests (Hauser *et al.* 1990) kann bei Verdacht auf heterozygoten oder milden OTC-Mangel mit unklaren passageren bzw. intermittierenden Hyperammonämien hilfreich sein (Zschocke und Hoffmann 2004).

Durch den Allopurinoltest lässt sich ein erhöhter Umsatz der Pyrimidinsynthese nachweisen. Nach Inhibition der Orotidinmonophosphat (OMP)-Decarboxylase durch Oxipurinolribonukleotid (Reaktionsprodukt von Allopurinol *in vivo*) lässt sich die Ausscheidung von Orotsäure und Orotidin im Urin quantifizieren. Erhöhte Werte als Ausdruck einer erhöhten Pyrimidinsynthese sind ein typischer Befund beim OTC-Mangel. Eine Darstellung der biochemischen Zusammenhänge ist in der folgenden Abbildung, Bild 1-9, zu sehen.



**Bild 1-9** Darstellung der Zusammenhänge zwischen intra-mitochondrialen und cytoplasmatischen Carbamylphosphat, Pyrimidinbiosynthese und Allopurinolmetabolismus bei OTC-Mangel.

Die Akkumulation von Carbamylphosphat im Mitochondrium von Patienten mit OTC-Mangel führt zur Diffusion von Carbamylphosphat in das Cytoplasma, wodurch die Pyrimidinbiosynthese stimuliert wird. Oxipurinolribonukleotid, ein Metabolit von Allopurinol, wirkt inhibitorisch auf die OMP-Decarboxylase. Daraus resultiert ein Anstieg von Orotidin-5'-Phosphat und dessen Vorstufe Orotsäure, was letztlich eine Orotazidurie und Orotidinurie bedingt (Hauser *et al.* 1990).

**Durchführung**

Bereits 24 Stunden vor Testbeginn ist auf die Einhaltung der diätetischen Vorschriften zu achten (Vermeiden von Coffein / Alkohol sowie benzoathaltigen Getränken und Einschränkung der Flüssigkeitszufuhr). Testbeginn ist am besten morgens. Nach dem Aufstehen sollten im Spontanurin die Ausgangswerte von Orotsäure, Orotidin und Kreatinin bestimmt werden.

Nach einer einmaligen oralen Gabe von Allopurinol, deren Dosis vom Alter abhängig ist (100 mg bei <6J.; 200 mg bei 6-10J.; 300 mg bei >10J.), erfolgt die Sammlung von Urin in vier 6 Stunden-Perioden: 0-6 Stunden, 7-12 Stunden, 13-18 Stunden und 19-24 Stunden.

Mittels HPLC (High Performance Liquid Chromatography) werden in allen Proben Orotidin und Orotsäure quantifiziert. Die Ausscheidung von Orotsäure und Orotidin wird in Relation zu Kreatinin ( $\mu\text{mol}/\text{mmol}$  Kreatinin) ausgedrückt.

Die Auswertung des Allopurinoltests erfolgt anhand von Referenzwerten für Orotidin und Orotsäure (Burlina *et al.* 1992; Hauser *et al.* 1990).

Ein übermäßiger Anstieg von Orotsäure und Orotidin spricht für einen erhöhten Durchsatz in der Pyrimidinsynthese. In der Literatur wird eine Sensitivität zwischen 80 und 100 Prozent und eine Spezifität über 90 Prozent angegeben (Arranz *et al.* 1999; Hauser *et al.* 1990; Maestri *et al.* 1998). Mit der Bestimmung von Orotidin erreiche man die höchste Sensitivität (91 Prozent) (Hauser *et al.* 1990; Maestri *et al.* 1998; Arranz *et al.* 1999; Grünewald *et al.* 2004), aber eine geringe Spezifität (70 Prozent) (Grünewald *et al.* 2004). Es werden sowohl falsch positive als auch falsch negative Testergebnisse beobachtet. Zum einen ist der Test von dem Metabolismus von Allopurinol in Oxipurinol abhängig. Zum anderen können eine hohe Restenzymaktivität wie bei milden Mutationen oder günstigem Mosaik ein falsch-negatives Testergebnis bedingen (Bowling *et al.* 1999). Ebenso können Störungen in der Pyrimidinbiosynthese oder aber methodische Probleme zu verfälschten Testergebnissen führen (Hauser *et al.* 1990; Zschocke u. Hoffmann 2004).

#### 4.5.2 Molekulare Diagnostik

Die Mutationsanalyse ist prinzipiell das beste Nachweisverfahren zur Ermittlung eines potentiellen Trägers einer Mutation. Nach den Untersuchungen von Pelet *et al.* [1990] liegt die Wahrscheinlichkeit, dass die Mutter eines erkrankten Sohnes (Über-)Trägerin der Mutation ist, bei 84 Prozent (Pelet *et al.* 1990).

Tuchman *et al.* [1995] schätzt das Risiko auf mindestens 90 Prozent (Tuchman *et al.* 1995a). Deshalb ist die molekulargenetische Untersuchung von Indexpatienten mit neu diagnostiziertem OTC-Mangel und die nachfolgende Testung von Familienangehörigen von großer Bedeutung.

Kann die ursächliche Mutation nicht gefunden werden, stehen ggf. eine Reihe von informativen Polymorphismen für Kopplungsanalysen in Familien zur Verfügung (Plante und Tuchman 1998).

#### 4.6 Pränataldiagnostik

Die Durchführung einer pränatalen Diagnostik verlangt eine Auseinandersetzung der Ratsuchenden mit ethischen Fragestellungen, insbesondere bei Feststellung eines erkrankten Fetus. Eine pränatale Diagnostik ist auf molekulargenetischer Ebene möglich und an die Durchführung einer Chorionzottenbiopsie ab der 11. Schwangerschaftswoche oder einer Amniozentese ab der 14. Schwangerschaftswoche geknüpft. Notwendig ist in der Regel die Kenntnis der krankheitsverursachenden Mutation bei einem betroffenen Familienmitglied.

Die Bestimmung der OTC-Aktivität in fetalem Lebergewebe ab der 20. Schwangerschaftswoche (Rodeck *et al.* 1982), wird in Ausnahmefällen versucht (bei fehlendem Mutationsnachweis in der Familie), ist aber mit einem hohen Fehlgeburtenrisiko verbunden. Eine Bestimmung der OTC-Aktivität in humanen Chorionzotten oder in Amnionzellen ist nicht möglich.

## 5 Therapie

Man muss zwischen einer Akuttherapie mit dem Ziel der Senkung des neurotoxischen Ammoniaks und einer Dauerbehandlung für eine ausgeglichene Stoffwechsellage unterscheiden.

### 5.1 Notfallbehandlung

Bei einer Hyperammonämie mit Werten von  $>200 \mu\text{mol/l}$  bzw.  $>350 \text{ mg/dl}$  ist eine Notfallbehandlung indiziert. Deren Prinzip ist der sofortige Stop der Proteinzufuhr, die Umkehr einer katabolen Stoffwechsellage durch hochkalorische Infusionen; Optimierung der verbliebenen Funktion des Harnstoffzyklus durch Arginingabe und Gabe von Medikamenten wie Natriumphenylbutyrat und / oder Natriumbenzoat zur Ammoniakspiegelsenkung über alternative Stoffwechselwege.

Bei  $\text{NH}_3$ -Werten  $>400 \mu\text{mol/l}$  bzw.  $>700 \text{ mg/dl}$  ist unverzüglich eine extrakorporale Entgiftung durch Hämodiafiltration, gegebenenfalls Hämofiltration oder –dialyse einzuleiten.

Eine engmaschige Kontrolle der Laborparameter ist erforderlich.

Mehrtägiges Koma und Hirndruckzeichen lassen eine eher schlechte Prognose erwarten.

### 5.2 Dauerbehandlung

Das Ziel der Dauertherapie ist es, eine ausgeglichene Stoffwechselsituation zu schaffen und zu erhalten, um eine irreversible Hirnschädigung durch rezidivierende Hyperammonämien zu vermeiden.

Es werden die folgenden Leitlinien empfohlen (Vademecum Metabolicum, Zschocke/Hoffmann, 2004):

1. Erhaltung des anabolen Stoffwechsels
2. Begrenzte Proteinzufuhr
3. Substitution von Arginin und bei schweren OTC-Defekten Citrullin
4. Zusätzliche Ammoniakentfernung: Na-Benzooat (eliminiert äquimolar Glycin), und Na-phenylbutyrat (eliminiert äquimolar Glutamin)
5. Supplementierung von Vitaminen und Spurenelementen
6. ggf. Lactulose (bindet durch sauren pH Darmammoniak)

Die Kontrolle von Wachstum und Entwicklung sowie die Aufrechterhaltung der Normwerte für Plasma-Ammoniak, Glutamin und Arginin sind wichtige Parameter, um den Erfolg der Therapie zu überprüfen.

### 5.3 Andere Therapieformen

Bei Patienten mit milderer Formen eines Harnstoffzyklusdefektes kann eine ausgeglichene Stoffwechsellaage durch diätetische Maßnahmen und Gabe von Medikamenten zur Ammoniakspiegelsenkung über alternative Stoffwechselwege erreicht werden. Viele Patienten sprechen jedoch nur unzureichend auf diese konventionelle Therapieformen an. Die Lebertransplantation als kurative Therapieform stellt bei diesen Patienten eine bedeutende Therapieoption dar, um die Zerstörung des Gehirns durch wiederkehrende Hyperammonämien aufzuhalten (Hasegawa *et al.* 1995). Indikationen für eine Lebertransplantation bei Patienten mit Harnstoffzykluserkrankungen sind (1) eine schwere Verlaufsform der Erkrankung mit schlechter Prognose wie beispielsweise der Neonatal-onset Form des OTC-Mangels, (2) eine progressive Lebererkrankung, welche zum Leberversagen führt wie teilweise bei Patienten mit Argininosuccinacidurie und (3) mit anderen Therapieformen nicht beherrschbare Krankheitsverläufe. Es ist nicht bekannt, wie viele Lebertransplantationen insgesamt bisher bei Patienten mit Harnstoffzyklusdefekten durchgeführt worden sind. Einen Überblick über die bisher in der Literatur veröffentlichten Fälle gibt eine Arbeit von Leonard and McKiernan (2004). Hiernach war bei 59 Patienten mit Harnstoffzyklusdefekten eine Transplantation durchgeführt worden, wovon 32 Fälle (über 50%) Patienten mit OTC-Mangel waren. Die Überlebensrate war 93% insgesamt bzw. 90% bei Patienten mit OTC-Mangel. Abgesehen von der durch die Transplantation verbesserten Lebensqualität der überlebenden Patienten, gibt es jedoch nur spärliche Informationen über das neurologische Outcome. Grundsätzlich ist davon auszugehen, dass eine neurologische Verschlechterung verhindert wird, und sich sogar in einigen Fällen die intellektuelle Leistung verbessert (Fletcher *et al.* 1999, Whittington *et al.* 1998).



Horslen et al. (2003) berichten über eine isolierte Hepatozytentransfusion mittels Umbilikalvenenkatheter in die Pfortader bei einem männlichen Neugeborenen mit schwerem OTC-Mangel. Oberstes Ziel ist das Verhindern einer Hyperammonämie, um eine optimale neurologische Entwicklung zu gewährleisten. Bisher ist diese therapeutische Intervention, bei welcher die transfundierten Hepatozyten als transiente „Enzymquelle“ fungieren, bei 3 Patienten mit OTC-Mangel durchgeführt worden. Sie ist als Brücke zur endgültigen Therapie, einer Lebertransplantation, zu sehen (Horslen *et al.* 2003; Leonard and McKiernan 2004).

Gentherapeutische Studien mit dem Ziel, den Defekt zu korrigieren, wurden zunächst unterbrochen, da Adenovirusvektoren nicht zu einem signifikanten Anstieg der Enzymaktivität geführt haben (Raper *et al.* 2002) und schwere Komplikationen bis hin zum Tod eines Patienten aufgetreten sind.

## 6 Prognose

Der OTC-Mangel vom Typ Neonatal-onset ist eine verheerende Erkrankung sowohl in Hinblick auf die Mortalität als auch auf die kognitive Entwicklung (Maestri *et al.* 1999). In einer Arbeit von Msall *et al.* [1984] wurde das Outcome von 26 überlebenden Kindern untersucht. Bei einem Großteil der Kinder wurden neurologische Auffälligkeiten festgestellt. Der durchschnittliche IQ betrug  $43 \pm 6$ . Es bestand eine signifikante Korrelation zwischen der Dauer des hyperammonämischen Komas und den intellektuellen Fähigkeiten. Diese Prognose kann durch eine frühe Diagnose und früh einsetzende Therapie verbessert werden (Msall *et al.* 1984).

Patienten, deren Therapie schon auf das Verhindern eines hyperammonämischen Komas ausgerichtet war, zeigten eine bessere neurologische Entwicklung als Patienten, die ein hyperammonämisches Koma überlebten: Insgesamt war ihr IQ signifikant höher, sie hatten weniger Krampfleiden und keiner hatte eine Zerebralparese. Das hyperammonämische Koma scheint hauptsächlich für die untersuchten Unterschiede in der Entwicklung verantwortlich zu sein (Maestri *et al.* 1991).

Bei Patienten mit OTC-Mangel vom Typ Late-onset, einschließlich klinisch symptomatischer Mädchen, kann eine adäquate Therapie zu einer Verbesserung der Verhaltensauffälligkeiten führen, eine Reduktion der hyperammonämischen Episoden und eine Stabilisierung der intellektuellen Fähigkeiten bewirken (Brusilow und Horwich 1995).

Eine neuere Untersuchung bezüglich des neurologischen und kognitiven Outcomes von 28 an OTC-Mangel erkrankten Kindern, darunter 5 Jungen, ergab, dass die Anzahl der durchgemachten hyperammonämischen Enzephalopathien weniger aussagekräftig als die Plasma-Ammoniak-Konzentration sei, um eventuelle neurologische und kognitive Defizite vorherzusagen (Nicolaidis *et al.* 2002).

## D Ziele der Untersuchung

Die molekulare Diagnostik als ein fester Bestandteil in der Sicherung der Diagnose des OTC-Mangels, erfordert in erster Linie zuverlässige, aber auch praktikable Nachweisverfahren zur Detektion von krankheitsauslösenden genetischen Veränderungen.

Ziel der vorliegenden Studie war die Etablierung und Evaluierung der Denaturierungsgradientengel-Elektrophorese (DGGE) für den Nachweis von Mutationen im *OTC*-Gen. Die Methode hat potenziell eine Sensitivität von 100% für den Nachweis von DNA-Veränderungen, deutlich höher als die Sensitivität der verbreiteten SSCP-Screeningmethode von 80-90%, und ist gleichzeitig deutlich weniger aufwändig und kostengünstiger als die direkte Sequenzierung.

Die vorliegende Arbeit ist in zwei experimentelle Teile gegliedert. Der erste Teil umfasste die Entwicklung optimaler PCR-Konditionen, die Erprobung und Optimierung der Elektrophoresebedingungen der DGGE sowie die Auswertung der jeweiligen Bandenmuster. Hierfür standen uns drei Patientenkollektive mit gesicherter molekularer Diagnose zur Verfügung. Die Kontrolle der gefundenen Ergebnisse erfolgte durch direkte Sequenzanalyse.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde die DGGE als Screeningverfahren der Routine-Diagnostik bei Patienten mit Verdacht auf OTC-Mangel eingesetzt. Zur genauen Charakterisierung der im Screeningverfahren detektierten Veränderungen erfolgte ebenfalls die exonspezifische Sequenzierung. Zusätzlich wurde die Promotorregion sowie die an die Exongrenzen angrenzenden Intronsequenzen analysiert, um auch Spleißmutationen erfassen zu können.

## KAPITEL II : METHODIK

### A Methodenwahl

#### 1 Molekulargenetische Diagnostik

Methodisch unterscheidet man zwischen einem direkten Gentest, bei dem die zur Erkrankung führende(n) Mutation(en) nachgewiesen oder ausgeschlossen wird (werden) und der indirekten Gendiagnostik, bei dem der eine krankheitsrelevante Mutation tragende Chromosomenabschnitt in einer Familie untersucht wird (Kopplungsanalyse). Die Durchführung der direkten Gentests setzt die Kenntnis des krankheitsverursachenden Gens voraus, während bei der indirekten Diagnostik nur die Genregion bekannt sein muss.

Die meisten Krankheiten werden durch zahlreiche unterschiedliche Mutationen im gleichen Gen bedingt, was die Durchführung von genetischen Tests erschwert. In der Regel müssen molekulargenetische Methoden daher zahlreiche unterschiedliche Mutationen in einem Gen nachweisen können.

Mutationserkennung kann auf der RNA-, DNA- und Proteinebene erfolgen.

Drei methodische Prinzipien bilden die Grundlage der meisten molekularen humangenetischen Untersuchungen auf DNA Ebene:

1. Die Bindung von zwei einzelsträngigen DNA-Sequenzen nach dem Prinzip der Basenpaarung (Hybridisierung).
2. Die Vervielfältigung von DNA-Fragmenten durch die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR).
3. Die Auftrennung von DNA-Fragmenten im elektrischen Feld aufgrund ihrer elektrischen Ladung und verschiedener Parameter wie Größe.

## 1.1 Die Polymerasekettenreaktion (PCR)

1984 veröffentlichte *Kary Mullis* eine neue Methode zur *in vitro* Amplifizierung von spezifischen Nukleinsäure-Fragmenten, die inzwischen zur am meisten verwendeten Standardmethode in der Molekulargenetik avancierte, da sie einfach und schnell anzuwenden ist, und außerdem auch ohne die Verwendung vitaler Zellen durchführbar ist.

Das Prinzip der Polymerasekettenreaktion (PCR = engl. *polymerase chain reaction*) setzt sich im wesentlichen aus den drei Schritten Denaturierung, Anheften der Oligonukleotide sowie Extension zu neuen Doppelsträngen zusammen, welche in Form von Zyklen wiederholt werden, was eine exponentielle Zunahme der amplifizierten DNA-Moleküle ergibt. Für die Amplifizierung einer spezifischen Sequenz eines DNA-Doppelstranges erfolgt zunächst eine Trennung der komplementären DNA-Stränge durch Denaturierung bei 90-95°C. Darauf folgend wird das Gemisch auf etwa 50-60°C abgekühlt und zwei aus ca. 15-25 Basen bestehende Oligonukleotide (Primer) zugesetzt, die jeweils der Sequenz an den 5'-Enden der beiden Einzelstränge komplementär sind. Durch Zusatz einer thermostabilen DNA-Polymerase werden die beiden Einzelstränge zum jeweiligen Doppelstrang komplementiert und die zwischen den Primern gelegene Zielsequenz verdoppelt. Das üblicherweise verwendete Enzym aus dem in heißen Quellen lebenden Organismus *Thermophilus aquaticus*, Taq-Polymerase, macht die Zugabe von neuer Polymerase nach jeder Denaturierung, welche zuvor eine Inaktivierung der Polymerasen zur Folge hatte, überflüssig.

Anschließend wird der aus Denaturierung, Anlagerung der Primer und Extension bestehende Reaktionszyklus 30-40 Mal wiederholt, woraus eine exponentielle Zunahme der amplifizierten DNA-Moleküle folgt. Schon 20 Reaktionszyklen ergibt sich unter realistischen Bedingungen in der Praxis eine  $10^5$ -fache Amplifizierung der Zielsequenz. Die einzelnen Reaktionszyklen werden in automatisierten Thermocyclern durchgeführt, so dass eine enorme Amplifizierung geringster Mengen Zielsequenz in kürzester Zeit erfolgt.

Ursprünglich wurde das PCR-Verfahren für die Amplifizierung von DNA-Fragmenten beschrieben. Inzwischen finden eine Reihe von Varianten der PCR-Technik wie beispielsweise die RT-PCR mit RNA als Ausgangsmaterial, Anwendung. Unabdingbare Voraussetzung für alle PCR-Experimente sind Negativkontrollen, um eine Kontamination durch nicht zum PCR-Ansatz gehörende DNA auszuschließen.

## 1.2 Detektion von unbekannten Mutationen

### 1.2.1. Screeningmethoden

Methoden zur Diagnostik unbekannter Mutationen werden auch als Screeningmethoden bezeichnet. Gebräuchliche Verfahren sind die Gelelektrophorese mit Denaturierungsgradienten (DGGE), Analyse von Einzelstrang-Konformationspolymorphismen (SSCP), Heteroduplexanalyse, Denaturierende Hochdruckflüssigkeitschromatographie (Denaturing high performance liquid chromatography, DHPLC), chemische Spaltung an Fehlpaarungsstellen (CCM) und enzymatische Spaltung an Fehlpaarungsstellen (EMC).

#### **Denaturierungsgradientenelektrophorese (DGGE)**

Diese Methode wird im folgenden genauer dargestellt. Man lässt doppelsträngige PCR-Produkte in einem Elektrophoresegel wandern, das eine zunehmende Konzentration eines denaturierenden Agens enthält. Die DNA-Moleküle wandern bis zu der Position im Gel, an der die Duplexstrukturen aufschmelzen und in Einzelstränge getrennt werden. Basenveränderungen werden durch eine veränderte Schmelzposition nachweisbar. Mit dieser Methode können nahe 100% der Mutationen detektiert werden (Cotton 2000).

*Vorteile:* Kosteneffiziente, hocheffiziente Methode zur Mutationsanalyse von Sequenzabschnitten, welche mehrere hundert Basenpaare umfassen können.

*Nachteile:* Herstellung eines Gradientengels notwendig; Entwicklung spezifischer Primer. Analyse problematisch bei GC-reichen Sequenzabschnitten eines Genes.

**Single-Strand Conformational polymorphism analysis (SSCP)**

Denaturierte, einzelsträngige PCR-Produkte werden auf einem nichtdenaturierenden Polyacrylamidgel aufgetrennt. Analysiert wird die elektrophoretische Mobilität der einzelsträngigen DNA, die von der Länge der Molekülkette, der DNA-Sequenz und der Konformation abhängig ist. In der einfachsten Form der Durchführung liegt die Mutationsdetektionsrate zwischen 50-80% (Cotton 2000).

*Vorteile:* Keine besonderen technischen oder methodischen Anforderungen.

*Nachteile:* Sensitivität begrenzt, v.a. von PCR-Produktgröße abhängig (optimal zwischen 150-300 bp).

**Heteroduplexanalyse**

Ein doppelsträngiges PCR-Produkt der genomischen DNA eines Mutationsträgers kann aus zwei identischen DNA-Strängen bestehen (Homoduplex) oder aus einem Strang der Wildtypsequenz und einem Strang der mutierten Sequenz (Heteroduplex).

Heteroduplex und Homoduplex können sich im Laufverhalten in der Gelelektrophorese unterscheiden. Ein abweichendes Bandenmuster ist ein Hinweis auf das Vorliegen einer Sequenzveränderung.

*Vorteile:* Keine besonderen technischen oder methodischen Anforderungen. Mit SSCP-Analyse kombinierbar.

*Nachteile:* Beschränkte Sensitivität

**DHPLC**

Durch die Einführung von HPLC-Methoden wie die Denaturing high performance liquid chromatography (DHPLC) liegt die Detektionsrate bei ca. 90-95% (Cotton 2000).

*Vorteile:* Hohe Sensitivität, keine besonderen Primer, automatisiertes Verfahren ohne Gel

*Nachteile:* Aufwändige Apparate notwendig, aufwändige Optimierung der Analytik, schlechte Sensitivität für homozygote Mutationen, hohe Kosten

**Chemical cleavage of mismatches (CCM) und Enzyme mismatch cleavage (EMC)**

Eine radioaktiv markierte Sonde wird mit der Test-DNA hybridisiert. Bei CCM erfolgt der Nachweis der Fehlpaarungsstellen mit Hilfe von chemischen Reaktionen, die einen DNA-Strang an einer solchen Stelle spalten. Bei EMC werden bestimmte Enzyme zum Schneiden an Fehlpaarungsstellen eingesetzt.

*Vorteile:* CCM nahezu 100% Sensitivität, für Fragmente bis zu 2 kb Länge anwendbar, grobe Lokalisation möglich.

*Nachteile:* Bei EMC Verwendung radiomarkierter RNA bei niedriger Sensitivität (50-70%). CCM ist eine sehr zeit- und arbeitsaufwendige Methode, für die der Gebrauch von toxischen Chemikalien erforderlich ist.

### 1.2.2. Sequenzanalyse

Die direkte Sequenzierung eines definierten DNA-Abschnittes gibt Aufschluss über die genaue Basenabfolge und kann damit den Beweis für das Vorliegen einer Mutation liefern. Es ist eine sehr präzise Strukturanalyse zur Aufklärung der Sequenzfolge.

*Vorteile:* Hohe Sensitivität und Spezifität, hoher Informationsgehalt

*Nachteile:* In Abhängigkeit von Anzahl der Exons arbeitsaufwändig und kostenintensiv. Mit Hilfe moderner Automatisierungsverfahren hat sich die direkte Sequenzierung für kleine Gene als primäres Analyseverfahren vielerorts durchgesetzt. Die Kombination mit einer Screeningmethode erlaubt allerdings eine deutliche Verringerung des Arbeitsaufwandes und der Kosten.

## 2 Methode der Wahl

Wie dargestellt, gibt es eine Reihe von verschiedenen molekularbiologischen Methoden zum Mutationsscreening. Wir wählten die DGGE-Analyse für die diagnostische Mutationsdetektion bei OTC-Mangel. Sie stellt eine hochsensitive, reproduzierbare Methode dar, welche zur Detektion von genomischen Veränderungen wie Insertion, Deletion bis hin zur Substitution einer einzelnen Base bestens geeignet ist. Im Vergleich zu anderen Screeningmethoden bietet die DGGE Analyse methodische Vorteile, vor allem eine hohe Sensitivität. Diese hohe Sensitivität wird auch ohne zusätzlichen Optimierungsaufwand erreicht. Trotz Verwendung von chemischen Gradientengelen und spezifischen Primern ist die Methode relativ kostengünstig. Es können sowohl heterozygote als auch homozygote Varianten identifiziert werden, was z.B. bei der Heteroduplexanalyse nicht der Fall ist. Die Analyse größerer Probandengruppen ist möglich.



## 2.1 Denaturierungs-Gradienten-Elektrophorese (DGGE)

Die Denaturierungs-Gradienten-Gelelektrophorese ist eine Screeningmethode zur Detektion bekannter und unbekannter Mutationen in der molekulargenetischen Routinediagnostik. Das Prinzip der DGGE wurde von Fischer und Lerman 1979 publiziert und nachfolgend zur Detektion von Punktmutationen in verschiedenen Genen angewandt (Fischer u. Lerman 1979). Untersucht werden Unterschiede der Schmelztemperatur von DNA-Fragmenten, welche mittels PCR hergestellt wurden.

Die Temperatur, bei der doppelsträngige DNA denaturiert und sich die Einzelstränge voneinander lösen, ist von der DNA-Sequenz abhängig und kann durch Mutationen verändert werden. Eine zunehmende Konzentration eines denaturierenden Agens (z.B. Formamid) führt zur Dissoziierung und Retardierung der DNA an einer bestimmten Stelle im Gel. Unterschiede in der Schmelztemperatur resultieren in einer früheren oder späteren Denaturierung und führen so zu einer Verschiebung des Bandenmusters, so dass Heteroduplexe im Gel in Bereichen niedrigerer Konzentrationen von denaturierendem Agens stehen bleiben als die korrespondierenden Homoduplexe.

Durch die Verwendung von PCR-Primern, denen eine 40-60 bp lange "GC-Klammer" angefügt wurde, kann eine gleichmäßige Schmelztemperatur des PCR-Produktes bei bleibender Verbindung der beiden Stränge erreicht werden, was die Detektion von Mutationen in allen Domänen ermöglicht (Sheffield *et al.* 1989). Die Primerauswahl erfolgt mit Hilfe von speziellen Computerprogrammen, in denen sich die Schmelzeigenschaften der spezifischen PCR-Produkte untersuchen lassen, um Domänen mit einer hohen Schmelztemperatur außerhalb der GC-Klammer zu vermeiden. Nach PCR und Erzeugung von Heteroduplexen wird die DNA direkt auf ein Polyacrylamidgel aufgetragen. Die Darstellung der Banden erfolgt durch Färbung mit Ethidium-Bromid. In der DGGE-Analyse findet sich bei Homozygotie eine einzelne Bande, während man bei Heterozygotie 2 bis 4 verschiedene Banden erkennen kann.

Es ist möglich, verschiedene Mutationen anhand spezifischer Bandenmuster voneinander zu unterscheiden. Für den Nachweis X-chromosomal gekoppelter Mutationen bei männlichen Personen kann die Zugabe von *Wildtyp*-DNA zur untersuchenden männlichen DNA-Probe für die Erzeugung von Heteroduplexbanden notwendig sein.

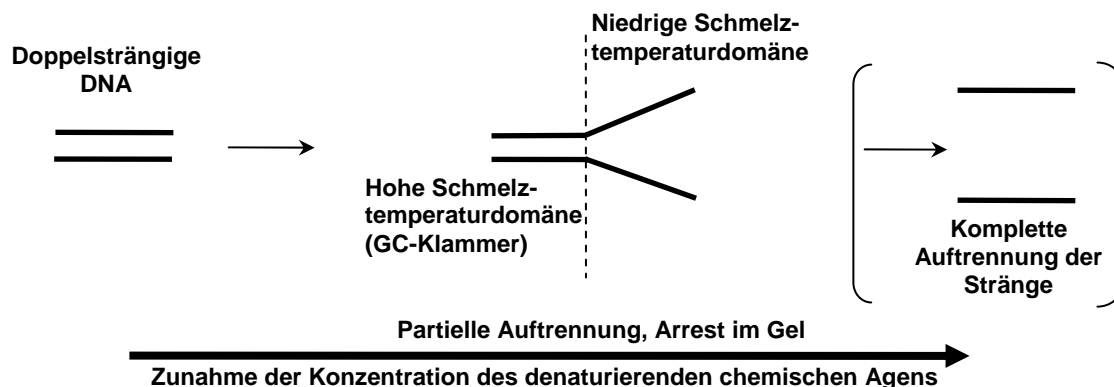


Bild 2-1 Schematische Darstellung des DGGE-Analyse Prinzips.

## 2.2 Sequenzierung

Zur Sequenzierung der genomischen DNA wurde eine Modifikation der von Frederick Sanger entwickelten enzymatischen Kettenabbruchmethode verwendet (Sanger *et al.* 1977). Hierzu folgt nach Amplifizierung der DNA mittels normaler PCR eine zusätzliche Cycle-Sequencing-PCR. Dazu verwendeten wir universelle Sequenzierprimer, die am 3'-Ende der PCR-Produkte ansetzen und der universellen Sequenz eines zusätzlichen Schwanzes der primären PCR-Primer entsprechen.

Die Analyse der Basensequenz wurde dadurch erreicht, dass die PCR in vier gleich große Ansätze aufgeteilt wird und zusätzlich zu den Desoxynukleosidtriphosphaten (dNTP) in jeden Ansatz eine geringe Menge eines spezifischen 2',3'-Dideoxynukleosidtriphosphates (ddATP, ddCTP, ddGTP, ddTTP) gegeben wird. Wird dieses Nukleotid anstelle des normalen Nukleotids in die wachsende Polynukleotidkette eingebaut, so wird das Kettenwachstum beendet, da keine freie 3'-OH-Gruppe für die Polymerisierung mehr vorhanden ist. Es entstehen dadurch also sequenzspezifische Kettenabbrüche. In dem Ansatz, in den beispielsweise zusätzlich dd-ATP gegeben wurde, weist jeder Kettenabbruch auf das Vorhandensein der Base Adenin an dieser Stelle der Sequenz hin.

Werden anschließend die vier Ansätze nebeneinander auf ein hochauflösendes Polyacrylamid-Gel aufgetragen, so treten nach der Elektrophorese die verschieden langen Fragmente in Form unterschiedlicher Banden auf, aus denen sich die Sequenz der amplifizierten DNA ablesen lässt. Die Banden können generell durch den Einsatz von fluoreszierend bzw. radioaktiv markierten Primern oder Terminatoren sichtbar gemacht werden.

Bei der vorliegenden Arbeit wurden fluoreszenzmarkierte Primer und zur automatisierten DNA-Sequenzierung der Sequenzierer ALFexpress (Amersham Biosciences, Freiburg) verwendet. Die bei der Cycle-Sequencing-PCR eingesetzten, mit Cy5 markierten Primer fluoreszieren im Laserlicht und werden während der Elektrophorese von Photometern während ihres „Vorbeiwanderns“ erfasst und von der Software aufgezeichnet.

Durch den Einsatz der universellen, am 5'-Ende fluoreszierend markierten Primer M13, M13 reverse, P51 und P172 bei der Cycle-Sequencing-Reaktion wird eine Markierung zahlreicher sequenzspezifischer Primer überflüssig, wodurch Zeit und Kosten eingespart werden, weil die universellen Primer für alle Exons einsetzbar sind, sofern bei der ersten PCR Primer mit den entsprechenden Schwänzen am 5'-Ende benutzt wurden (siehe Tabelle II-1 in Teil B-Materialien und Protokolle).

Es wurden jeweils beide gegenläufigen komplementären DNA-Stränge sequenziert, was die Genauigkeit der Methode noch erhöht und die Fehlerwahrscheinlichkeit verringert. Das detaillierte Protokoll zur Sequenzierung ist in Abschnitt B dieses Kapitels beschrieben.

## **B Materialien und Protokolle**

### **1 DNA-Extraktion**

#### *Aus peripheren Lymphozyten*

Venöse Blutproben werden in EDTA-Röhrchen gesammelt, bei 4°C gelagert (sofern notwendig) und so schnell wie möglich weiterverarbeitet, um den Verlust an DNA so gering wie möglich zu halten. Die Zellen werden, wie im Einzelnen unter 1.2 beschrieben, vom Plasma getrennt, die Erythrozyten lysiert und die DNA-enhaltenden Leukozyten durch Zentrifugation gesammelt. Die DNA-Extraktion erfolgt mit dem BACC2 Extraktions-Kit (Amersham Biosciences, Freiburg).

Anschließend wird die DNA in TE-Puffer suspendiert und bei –20°C gelagert.

#### *Aus Guthrie-Karten*

DNA für PCR-Analysen kann außerdem aus getrockneten Blutstropfen oder Guthrie-Karten extrahiert werden, selbst wenn diese schon über Jahre gelagert wurden.

Wir machten die Erfahrung, dass diese Proben, auch wenn sie quantitativ weniger DNA lieferten, ebenso gute Sequenzierungsergebnisse zuließen wie frisch extrahierte DNA aus Vollblut.

Die Blutstropfen sollten von ausreichender Größe und das Filterpapier gut durchtränkt sein. Die Extraktion der DNA erfolgt wie unter 1.4 dieses Kapitels beschrieben.

#### **1.1 Materialien**

BACC2 Extraktions-Kit (Amersham Biosciences, Freiburg); 5 M Natriumperchlorat (70%); Chloroform; Ethanol absolut; Chelex-Resin (5%ige Suspension Chelex 100 Resin BT der FA. Bio-Rad (München) in H<sub>2</sub>O); TE-Puffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA pH 7,4)

#### **1.2 DNA-Extraktion aus Vollblut**

1. 5 ml EDTA-Blut in einem 50 ml Polypropylen Röhrchen (Greiner Labortechnik, Frickenhausen) mit Reagenz A (Extraktions-Kit) auf 40 ml auffüllen und anschließend für 4 Minuten gründlich durchmischen.

2. 5 min bei 1300 g zentrifugieren.
3. Den Überstand verwerfen; das Pellet 2 ml Reagenz B des Nucleon-Extraktions-Kits resuspendieren, gründlich mischen und in 5 ml Röhrchen überführen.
4. 500 µl 5 M Natriumperchlorat-Lösung dazugeben und einige Sekunden schütteln.
5. 2 ml Chloroform dazugeben und 10 min mischen.
6. 2 min bei 800 g zentrifugieren.
7. Langsam 300 µl Nucleon Resin dazupipettieren und 4 min bei 1400 g zentrifugieren.
8. Den Überstand vorsichtig abpipettieren und in ein neues 50 ml Röhrchen umfüllen.
9. Die DNA mit kaltem Ethanol absolut ausfällen und mit einem dünnen, über der Bunsenbrennerflamme sterilisiertem Glasstab in ein weiteres Röhrchen zu 500 µl TE-Puffer überführen.
10. DNA-Stammlösung bei  $-70^{\circ}\text{C}$  lagern.

### 1.3 Bestimmung der DNA-Konzentration und Reinheit

1. 10 µl der DNA-Stammlösung in 90 µl destilliertem  $\text{H}_2\text{O}$  auflösen (1:10).
2. Die optische Dichte (OD) bei 260 nm bestimmen (Absorption mit der von  $\text{H}_2\text{O}$  als Standard vergleichen – Eine OD-Einheit entspricht einer DNA-Konzentration von etwa 50 µg/ml – Die Konzentration der DNA-Stammlösung (µg/ml) wird als  $\text{OD}_{260} \cdot 10 \cdot 50$  berechnet).
3. Die OD bei einer Wellenlänge von 280 nm bestimmen und die Ratio  $\text{OD}_{260}:\text{OD}_{280}$  berechnen (Eine Ratio von  $<1,65$  wäre Hinweis auf eine Proteinkontamination und würde eine weitere Aufreinigung der Probe erforderlich machen, was bei uns in keinem Fall notwendig war).
4. Die Konzentration der DNA-Stammlösung durch entsprechende Verdünnung auf 500 µg/ml einstellen.

### 1.4 DNA-Extraktion aus Guthrie-Karten

1. 1 ml steriles, destilliertes Wasser in ein 1,5 ml Eppendorf-Cup füllen und ein 3x3 mm großes Stück Papier aus dem getrocknetem Blutstropfen ausstanzen, dazugeben und vortexen.
2. Bei Raumtemperatur 15-30 min inkubieren und gelegentlich vortexen.
3. Für 2-3 min bei 10000-15000 g zentrifugieren.

4. Den Überstand vorsichtig entfernen und verwerfen, so dass nur das Pellet, das Papierstück und 20-30 µl der Flüssigkeit im Gefäß verbleiben.
5. Mit 5% Chelex zu einem Gesamtvolumen von 200 µl auffüllen und für 15-30 min im Wasserbad bei 56°C inkubieren.
6. Anschließend für 5-10 s bei max. Stärke vortexen.
7. In kochendem Wasser für weitere 8 min inkubieren.
8. Danach 5-10 s bei max. Stärke vortexen und für 2-3 min bei 10000-15000 g zentrifugieren.
9. 20 µl des Überstandes für PCR verwenden.
10. Den Rest der Probe tiefgekühlt lagern.

## 2 Primer

### 2.1 Primerauswahl

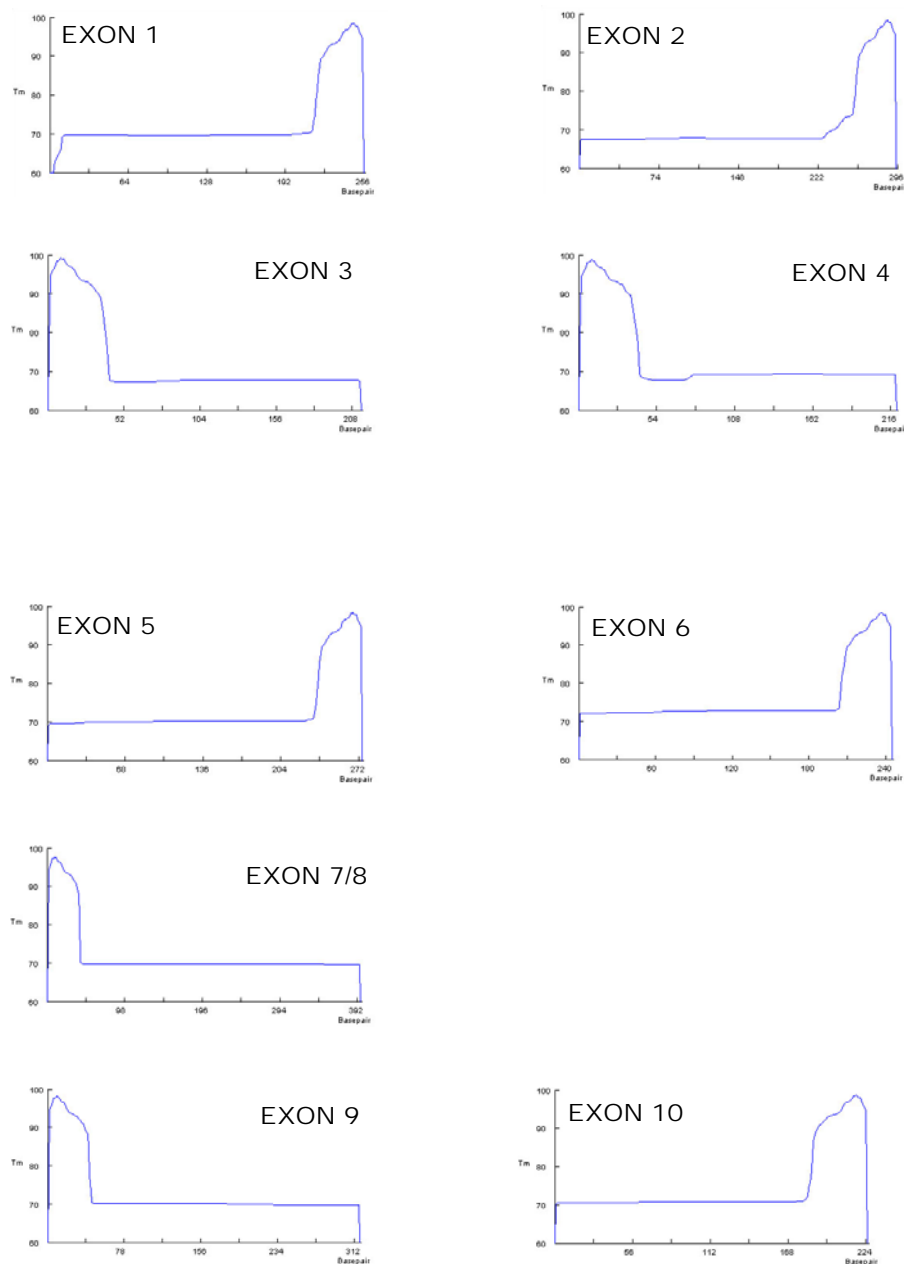
Die Primersequenzen für die Sequenzierung von Exon 2, 4, 5, 6, 7/8 und 9 übernahmen wir aus der Publikation von Matsuura et al. (Matsuura *et al.* 1993). Primer für Exon 1, 3 und 10 entwarfen wir mit Hilfe des Oligo-Programm (MedProbe) auf einem Macintosh-Computer selbst. Die Primersequenzen für die PCR-Amplifikationen der Promotorregion wurden uns freundlicherweise von der Arbeitsgruppe E. Bakker aus den Niederlanden zur Verfügung gestellt.

Allen Primern wurde ein 18-20 bp langer universaler Schwanz (M13, M13rev, P51 bzw. P172) zugefügt, welcher die Verwendung universeller Primersequenzen für die spätere Sequenzierung erlaubte. Primersequenzen sind in Tab. II-1 aufgeführt.

Nach der PCR zum Sequenzieren, wurden 5 µl des PCR-Produktes durch Gelelektrophorese auf einem Agarosegel dargestellt, um den Erfolg der Amplifikation zu überprüfen.

Die Primer für die DGGE wurden für alle zehn Exons des *OTC*-Gens mit OLIGO Primer Analysis Software (MedProbe, Oslo/Norwegen) auf einem Macintosh-Computer entworfen, um durch Anfügen einer entsprechenden "GC-Klammer" die spezifische Anlagerung und die zu erwartenden Schmelzeigenschaften zu simulieren.

Im folgenden sind die spezifischen Schmelztemperaturkurven der PCR-Produkte für alle Exons des *OTC*-Gens dargestellt.



**Bild 2-2 Schmelztemperaturkurven der PCR-Produkte für die DGGE von Exon 1 bis Exon 10 des OTC-Gens.** Auf der Abszissenachse ist die Basenpaarlänge (Basepair-bp) und auf der Ordinatenachse die Schmelztemperatur ( $T_m$ ) aufgetragen.

Synthetisiert wurden die Primer von der Firma GIBCO BRL (jetzt Invitrogen, Karlsruhe).

Die PCR lief entweder auf der Perkin Elmer PE 480 oder dem Gene Amp<sup>®</sup> PCR System 9700 (PE). Die Protokolle sind im Einzelnen dieses Kapitels beschrieben.

## 2.2. PCR-Amplifikation und Sequenzierung

**Tabelle II-1 Darstellung der Primersequenzen für die Sequenzierungsreaktion.** Der unterstrichene Bereich der Sequenz in F (Forward/Vorwärts) oder R (Reverse/Rückwärts) entspricht der Sequenz des jeweils verwendeten Universalprimers für die Cycle-Sequencing-Reaktion. Die Primersequenz von Exon 2, Exon 4 rückwärts, Exon 6, 7/8 und 9 entspricht der für die DGGE verwendeten Primersequenz. bp: Basenpaare.

	Primersequenzen in <i>Forward</i> (vorwärts) bzw. <i>Reverse</i> (rückwärts) Richtung	PCR- Produkt- größe	Univ. Primer- schwanz
<b>Promotor</b>	<i>F</i> 5' <u>TATGTAAAACGACGGCCAGT</u> GGTAGAAAAGTGAAATAAATGG 3'	438 bp	M13
	<i>R</i> 5' CAGGAAACAGCTATGACCTAAGAAATGTGTTCAGTTGCAG 3'		M13rev
<b>Exon 1</b>	<i>F</i> 5' TATAAGGGAACAAAAGCTGGTGGAGTTTCAAGGGCATAG 3'	201 bp	P51
	<i>R</i> 5' TATGTAAAACGACGGCCAGTTTCTTAAATCAAACCCAAGTC 3'		M13
<b>Exon 2</b>	<i>F</i> 5' TATGTAAAACGACGGCCAGTACCATAGTACATGGGTCTTTTCTGA 3'	288 bp	M13
	<i>R</i> 5' CAGGAAACAGCTATGACCAAAAAGGGGACTGGTAGTAACTGGAAC 3'		M13rev
<b>Exon 3</b>	<i>F</i> 5' TATTATAGGGCGAATTGGGTTATTTGGGGGCTAGTTATTAC 3'	271 bp	P172
	<i>R</i> 5' TATGTAAAACGACGGCCAGTTCAATCCCTCTCTTCAACAC 3'		M13
<b>Exon 4</b>	<i>F</i> 5' TATGTAAAACGACGGCCAGTGTTGAGATGATGGCCAATTCTTTGT 3'	261 bp	M13
	<i>R</i> 5' CAGGAAACAGCTATGACCCATCAGATTCTGAAATCAGCTTTG 3'		M13rev
<b>Exon 5</b>	<i>F</i> 5' TATGTAAAACGACGGCCAGTGCATTATTAAGCATAATTATCTTAG 3'	304 bp	M13
	<i>R</i> 5' CAGGAAACAGCTATGACCTTCACTTAAAGCAAGTCAGGAATTA 3'		M13rev
<b>Exon 6</b>	<i>F</i> 5' TATGTAAAACGACGGCCAGTTGGATTTCATCTCCTTCATCCCGTG 3'	239 bp	M13
	<i>R</i> 5' CAGGAAACAGCTATGACCGTGATTTAAGAGAGGGGTTAGTTTC 3'		M13rev
<b>Exon 7/8</b>	<i>F</i> 5' TATGTAAAACGACGGCCAGTCTTAAATAAGATTTAAATTCCTTCCT 3'	390 bp	M13
	<i>R</i> 5' CAGGAAACAGCTATGACCGGAATTAATGAACCTGAGAGAGCAT 3'		M13rev
<b>Exon 9</b>	<i>F</i> 5' TATGTAAAACGACGGCCAGTGCCACATATAATAGTCAAAAAGTGG 3'	312 bp	M13
	<i>R</i> 5' CAGGAAACAGCTATGACCATCTCACTTGCTTATTATTTCCCA 3'		M13rev
<b>Exon 10</b>	<i>F</i> 5' TATGTAAAACGACGGCCAGTCAGACTGTCGCTAATGTTTATC 3'	296 bp	M13
	<i>R</i> 5' TATAAGGGAACAAAAGCTGGCACAATGGCAAAGCATATCATAC 3'		P51

### 2.2.3 Die markierten Universalprimer für die Cycle-Sequencing-Reaktion

M13 5'  $\zeta$ -TAT GTA AAA CGA CGG CCA GT 3'

M13 rev 5'  $\zeta$ -CAG GAA ACA GCT ATG ACC 3'

P51 5'  $\zeta$ -TAT AAG GGA ACA AAA GCT GG 3'

P172 5'  $\zeta$ -TAT TAT AGG GCG AAT TGG GT 3'



## 2.3. DGGE

**Tabelle II-2 Darstellung der Primersequenzen für die DGGE.** Die GC-Klammern sind unterstrichen dargestellt. Aufgrund der notwendigen Schmelzeigenschaften ist neben der 40bp-GC-Klammer an einen der beiden Primer, zusätzlich an den jeweils zugehörigen Primer eine GC-Klammer von 5-6bp angehängt worden.

Primersequenzen in <i>Forward</i> (vorwärts) bzw. <i>Reverse</i> (rückwärts) Richtung		
<b>Exon 1</b>	<i>Forward</i>	5' TTAGTTTTTAGGTGGCCCCC 3'
	<i>Reward</i>	5' <u>CGCCCGCCGCGCCCCGCGCCCGTCCCGCCGCCCCCGCCCG</u> AGTTTTA TGCATCACCATGATTCCT 3'
<b>Exon 2</b>	<i>Forward</i>	5' <u>CGCCCGCACC</u> ATAGTACATGGGTCTTTTCTGA 3'
	<i>Reward</i>	5' <u>CGCCCGCCGCGCCCCGCGCCCGTCCCGCCGCCCCCGCCCG</u> AAAAAG GGGACTGGTAGTAACTGGAAC 3'
<b>Exon 3</b>	<i>Forward</i>	5' <u>CGCCCGCCGCGCCCCGCGCCCGTCCCGCCGCCCCCGCCCG</u> GATATAT TTTAATTCTATTCTTG 3'
	<i>Reward</i>	5' GTCTTCACCTTCAATCCCTCTCTT 3'
<b>Exon 4</b>	<i>Forward</i>	5' <u>CGCCCGCCGCGCCCCGCGCCCGTCCCGCCGCCCCCGCCCG</u> GTTTTTT CAAAATGATTTTTTTC 3'
	<i>Reward</i>	5' <u>GCCCGCCATCAGATTCTGAAATCAGCTTTG</u> 3'
<b>Exon 5</b>	<i>Forward</i>	5' <u>CCCCCGCCCGTATCTTAGATTATCTTTTTTC</u> 3'
	<i>Reward</i>	5' <u>CGCCCGCCGCGCCCCGCGCCCGTCCCGCCGCCCCCGCCCG</u> TGATTTT GCTCTTTTGTAAG 3'
<b>Exon 6</b>	<i>Forward</i>	5' <u>GCCCGTGGATTTCATCTCCTTCATCCCGTG</u> 3'
	<i>Reward</i>	5' <u>CGCCCGCCGCGCCCCGCGCCCGTCCCGCCGCCCCCGCCCG</u> GTGATTT AAGAGAGGGGTTAGTTTC 3'
<b>Exon 7/8</b>	<i>Forward</i>	5' <u>CGCCCGCCGCGCCCCGCGCCCGTCCCGCCGCCCCCGCCCG</u> CCATAAT AAGATTTAAATTCCTTCCT 3'
	<i>Reward</i>	5' <u>CGCCCGGAATTAATGAACCTGAGAGAGCAT</u> 3'
<b>Exon 9</b>	<i>Forward</i>	5' <u>CGCCCGCCGCGCCCCGCGCCCGTCCCGCCGCCCCCGCCCG</u> GCCACAT ATAATAGTCAAAAAGTGG 3'
	<i>Reward</i>	5' <u>GCCCGACTTCACTTGCTTATTATTCCCCA</u> 3'
<b>Exon 10</b>	<i>Forward</i>	5' <u>CGCCCGTCTAGGTCCCTAAGCAGACTGTCGC</u> 3'
	<i>Reward</i>	5' <u>CGCCCGCCGCGCCCCGCGCCCGTCCCGCCGCCCCCGCCCG</u> CAACTCA TTCTGTTACTGAAG 3'

## 3 Die Polymerasekettenreaktion (PCR)

### 3.1 PCR-Reagenzien

Die Primer wurden von der Firma GibcoBRL (jetzt Invitrogen, Karlsruhe) synthetisiert und in Form getrockneter Pellets geliefert. Diese waren entsprechend ihrer Konzentration in TE-Puffer zu verdünnen, um eine 100 µM Stammlösung herzustellen. Die Stammlösung wird 1:40 in H<sub>2</sub>O verdünnt, um eine 2,5 µM (Sequencing) bzw. 1:25 in H<sub>2</sub>O, um eine 4 µM (DGGE) Gebrauchslösung zu erstellen.

*Im einzelnen wurden verwendet:*

Platinum™ *Taq* DNA Polymerase od. *Taq* DNA Polymerase (5 U/μl), 10X PCR-Puffer und MgCl<sub>2</sub> (50 mM) waren als Set bei der Firma GibcoBRL (jetzt Invitrogen, Karlsruhe) erhältlich.

2 mM dNTP-Lösung (10X Konzentration) wurde durch Verdünnung von 60 μl dNTP (jedes Nukleotid 20 mM, (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg)) in 940 μl H<sub>2</sub>O hergestellt.

Die DNA-Stammlösung (500 μg/ml) wird 1:20 verdünnt, um eine Gebrauchslösung mit der Konzentration von 25 μg/ml zu erhalten.

### 3.2 PCR Ansatz und Konditionen

Die PCR wurde entweder mit der PE 480 oder mit Gene Amp® PCR System 9700 (jeweils Perkin Elmer, Applied Biosystems, Darmstadt) mit maximaler Aufheizgeschwindigkeit (Ramp Speed), durchgeführt. Bei der PE 480 musste dem Ansatz im letzten Schritt als Verdunstungsschutz ein Tropfen Mineralöl zugefügt werden.

Es wurde jeweils mit 15 μl (DGGE) bzw. 50 μl (Sequencing) Ansätzen gearbeitet, die sich wie unten beschrieben zusammensetzten.

Verwendung fanden dabei 200 μl PCR-Softtubes der Firma Biozym (Hessisch Oldendorf).

#### 3.2.1 PCR-Konditionen für die DGGE

##### Ansatz pro Cup

*15 μl-Ansatz zur DGGE:*

	<u>Volumen</u>	<u>Endkonzentration</u>
10XPCR-Puffer	1,5 μl	1x
50 mM MgCl <sub>2</sub>	0,45 μl	1,5 mM
2 mM dNTP	1 μl	133 μM
Primer (je 4 μM)	2 μl je Primer	~1 μM
<i>Taq</i> DNA Polymerase	0,1 μl	0,5 Units
Dest. H <sub>2</sub> O	7 μl	
DNA	1,0 μl	

**PCR-Zyklen zur DGGE**Exon 1, 2, 3, 4, 5, 6, 9, 10

<b>Denaturierung</b>	94°C	5 min
<b>38 Zyklen</b>	{ 94°C	45 sec
	{ 55°C	45 sec
	{ 72°C	45 sec
<b>Extension</b>	72°C	5 min
<b>Denaturierung</b>	94°C	5 min
<b>Heteroduplexformation</b>	{ 65°C	20 min
	{ 37°C	20 min
<b>Abkühlung</b>	4°C	Dauer

Exon 7/8

<b>Denaturierung</b>	94°C	5min
<b>38 Zyklen</b>	{ 94°C	45sec
	{ 52°C	45sec
	{ 72°C	45cec
<b>Extension</b>	72°C	5min
<b>Denaturierung</b>	94°C	5min
<b>Heteroduplexformation</b>	{ 65°C	20min
	{ 37°C	20min
<b>Abkühlung</b>	4°C	Dauer

**3.2.2 PCR-Konditionen für das Sequenzieren****Ansatz pro Cup***50 µl-Ansatz zum Sequenzieren:*

	<u>Volumen</u>	<u>Endkonzentration</u>
10XPCR-Puffer	5 µl	1x
50 mM MgCl <sub>2</sub>	1,5 µl	1,5 mM
2 mM dNTP	5 µl	0,2 mM
Primer (je 2,5 µM)	5 µl je Primer	250 nM
(Platinum™) Taq DNA Polymerase	(0,2 µl)-0,3 µl	(1)-1,5 Units
Dest. H <sub>2</sub> O	23,5 µl	
DNA	5 µl	125 ng

**PCR-Zyklen zum Sequenzieren**Promotorregion und Exon 1, 2, 3, 4, 5, 6, 9, 10

<b>Denaturierung</b>	94°C	5min
<b>15 Zyklen</b>	{ 94°C	30sec
	{ 55°C	60sec
	{ 72°C	60sec
<b>20 Zyklen</b>	{ 94°C	30sec
	{ 65°C	60sec
<b>Extension</b>	72°C	5min
<b>Abkühlung</b>	4°C	30min

Exon 7/8

<b>Denaturierung</b>	94°C	5min
<b>35 Zyklen</b>	{ 94°C	60sec
	{ 52°C	60sec
	{ 72°C	2min
<b>Extension</b>	72°C	7min
<b>Abkühlung</b>	4°C	30min

**4 Agarose Gelelektrophorese der PCR-Produkte****4.1 Materialien**

Loading-Puffer (5X): 30% Glycerin, 5% SDS, 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 0,1% BPB (3 ml Glycerin, 0,5 ml SDS, 10 mg Tris-HCl, 4 mg EDTA, 10 mg BPB, H<sub>2</sub>O ad 10 ml).

Größenstandard (1 kb Leiter): Gemisch aus 15 µl der 1 kb-Leiter (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg), 25 µl Loading-Puffer und 60 µl H<sub>2</sub>O.

Ethidiumbromid-Stammlösung: 0,5 mg/ml in dest. H<sub>2</sub>O.

**4.2 Methode**

1. Für mittelgroße Gele 3 g SEAKEM<sup>®</sup> Agarose (Bio Whittaker Molecular Applications, USA), NuSieve<sup>®</sup> Agarose (Bio Whittaker Molecular Applications,

USA) oder ein Gemisch beider zu 150 ml 1X TBE-Puffer (Bio Whittaker

Molecular Applications, USA) geben. Anschließend gründlich mischen und in der Mikrowelle so lange erhitzen, bis die Agarose vollständig aufgelöst ist.

2. Die Lösung auf etwa 50°C abkühlen lassen, 75 µl (0,5 µl pro ml Gel) Ethidiumbromid-Stammlösung dazugeben und gründlich mischen.
3. Die Agarose in eine Gelform gießen, den Kamm inserieren und das Gel auf Raumtemperatur abkühlen lassen, anschließend Kamm entfernen.
4. 5 µl des PCR-Produkts mit 2 µl Loading-Puffer mischen und in die Taschen des Gels pipettieren. Die 1 kb-Leiter als Standard in die anliegenden Taschen pipettieren.
5. Elektrophorese bei 5-10 V/cm (normalerweise 100 V) für eine angemessene Zeit laufen lassen.
6. Nach der Elektrophorese können die Banden unter UV-Licht sichtbar gemacht werden.

## 5 DGGE

### 5.1 Equipment

Gradienten-Mischer (BioRad, München) ca. 50 cm über dem Arbeitsplatz stehend

Modifiziertes Bio-Rad Protean II-Xi-Elektrophorese-System mit 16 cm Glasplatten, 1,0 mm Spacer und Kämmen

Wasserbad mit Pumpe (Grant, Cambridge, UK) zur Pufferzirkulation unter Konstanthaltung der eingestellten Temperatur

### 5.2 Materialien

40% Acrylamid (19:1) (Biozym, Hessisch Oldendorf), Formamid (Invitrogen, Karlsruhe), Urea (Invitrogen, Karlsruhe), 10X TAE-Puffer (Bio Whittaker, USA 16-011Y 6x1l), APS (Sigma, Taufkirchen A-9164, 25 g), TEMED (Sigma, Taufkirchen T-7024, 25 ml)

### 5.3 Herstellen der Gellösungen (6 % Polyacrylamidgel)

<b>Null-Lsg.:</b>	40% Acrylamid (19:1)	75 ml
	10X TAE-Puffer	50 ml
	H <sub>2</sub> O	ad 500 ml

Lagerung bei 4°C in lichtgeschützten Flasche.

<b>80% Denat.-Lsg.:</b>	40% Acrylamid (19:1)	75 ml
	10X TAE-Puffer	50 ml
	Deionisiertes Formamid	160 ml
	Urea	168 g
	H <sub>2</sub> O	ad 500 ml

Lagerung bei 4°C in lichtgeschützten Flasche.

#### Formamid-Deionisierung:

Ca. 15 g Mixed Bed Resin TMD-8 (Sigma, Taufkirchen M-8157; 100 g) + 0,5 l

Formamid ca. ½ h auf dem Rührer mischen; filtrieren

### 5.4 Durchführung

1. Scheiben mit Ethanol säubern; anschließend mit Glykol einreiben und einspannen.
2. 15 ml Null-Lsg. (=Low) sowie 15 ml 80%-Denaturierungs-Lsg. (=High) in je ein 50-ml-Falcon-Röhrchen geben und je 6 µl TEMED und je 100 µl APS (10%) zugeben und mischen.
3. *Gradienten-Mischer*: in die rechte Kammer L-Lsg. und in die linke (mit Haupthahn) H-Lsg. geben. Zuerst die Verbindung zwischen den Kammern aufdrehen, dann den Haupthahn und Gel langsam zwischen die Glasplatten laufen lassen.
4. Nach ca. 2 min Kamm einstecken; Gradienten-Mischer und Schlauch mit Aqua dest. säubern und Vorgang für das zweite Gel wiederholen.
5. Gele 30-60 min polymerisieren lassen.
6. Gerät (Protean II Xi-System von Bio-Rad) anstellen und auf Puffertemperatur von 58°C temperieren. Elektrophorese-Kammer mit 6,5 l 1XTAE-Puffer füllen.
7. Kamm ziehen und Taschen 2x mit 1XTAE-Puffer spülen und Puffer in Taschen füllen.
8. Gele in Ständer einklicken und mit 1XTAE Puffer auffüllen.

9. Taschen spülen und Proben laden (mit langer dünner Spitze):  
X1, X2, X3, X6, X9, X10      2 µl PCR-Probe + 2µl Loading Dye  
X4, X5, X7/8      4 µl PCR-Probe + 2µl Loading Dye
10. Ständer in Elektrophorese-Kammer stellen und zu folgenden Bedingungen starten:  
180V; 58°C (im Tank!); 6 Stunden Laufzeit
11. Entwicklung der Gele in Ethidiumbromidbad für 10 min und anschließend für  
10 min in Aqua dest. Bad legen.
12. Gel vorsichtig auf UV-Transluminator legen und fotografieren.

## 6 Sequenzierung der DNA

### 6.1 Materialien

Thermo Sequenase™ fluorescent labelled Primer Kit (Amersham LIFE SCIENCE) enthält A-, C-, G-, T- Reagenz (dNTP's, das entsprechende ddNTP, Magnesiumchlorid, Tween™ 20, Nonidet™ P-40, 2-Mercaptoethanol, thermostabile Pyrophosphatase und Thermo Sequenase DNA-Polymerase) und Formamid Loading-Dye (Formamid, EDTA und Methylviolett).

Sequagel-6 der Firma National Diagnostics umfaßt Monomerlösung (5,7% Acrylamid, 0,3% Methylen-Bisacrylamid und Harnstoff in 0,1 M Tris-Borat und 2 mM EDTA-Puffer, pH 8,3) und Pufferlösung (5X TBE-Puffer und Katalysator in deionisiertem dest. H<sub>2</sub>O).

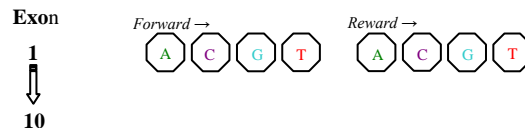
Ammoniumpersulfat (98%) von der Firma Sigma (Taufkirchen), 1X TBE-Puffer (0,1 M Tris-Borat und 2 mM EDTA, pH 8,3)

### 6.2 Cycle-Sequencing

1. Das gewünschte Exon, wie oben beschrieben, mittels PCR amplifizieren und 5 µl des PCR-Produktes zur Kontrolle auf einem Agarose-Gel laufen lassen. Das Produkt nur dann sequenzieren, wenn eine einzelne starke Bande sichtbar ist.
2. Das PCR-Produkt durch zentrifugieren über QIAquickspin (Qiagen, Hilden) Reinigungssäulchen den Herstellerangaben entsprechend aufreinigen.

3. Für jedes zu amplifizierende Exon zwei Ansätze erstellen (je einer pro DNA-Strang).

Von jedem Ansatz je 6 µl in vier 200 µl PCR-Softtubes pipettieren (jedes enthält 2 µl des entsprechenden A-; C-; G-, oder T-Reagenzes)



4. Die Cycle-Sequencing-PCR bei folgenden Konditionen auf dem Thermo-Cycler (Gene Amp<sup>®</sup> PCR System PE 9700) mit maximaler Ramp Speed laufen lassen:

<b>Denaturierung</b>	94°C	5min
<b>25 Zyklen</b>	{	94°C 30sec
<i>Annealingtemperatur</i>		68°C 30sec
<b>Extension</b>	72°C	5min
<b>Abkühlung</b>	4°C	30min

5. Anschließend 2 µl Formamid Loading-Dye zu den PCR-Produkten pipettieren und möglichst bald zum Sequenzieren auf das Polyacrylamid-Gel auftragen.

### 6.3 Herstellung des Polyacrylamid-Gels

1. Die Glasplatten gründlich mit nichtfluoreszierendem Detergenz (Alconox, Aldrich) reinigen, mit destilliertem Wasser und Ethanol absolut abspülen und trocknen lassen.
2. Die Deckplatte unter Verwendung der 0,5 mm Spacer auf der Basis positionieren und mit Halteklammern arretieren. Den Kamm etwa bis zur Hälfte am oberen Ende der Apparatur zwischen die Platten schieben.
3. 40 ml Monomerlösung und 10 ml Pufferlösung (SequaGel-6) in einen dickwandigen Erlenmeyerkolben füllen und unter Rühren für 2-5 min entgasen.
4. 400 µl frisch angesetzter 10%iger Ammoniumpersulfat Lösung zugeben und behutsam mischen.
5. Die Lösung vom unteren Rand her mit einer Spritze vorsichtig zwischen die Platten füllen und dabei die Entstehung von Luftblasen vermeiden.



6. Den Kamm nun vollständig einführen, mit Klammern fixieren und das Gel für etwa zwei Stunden polymerisieren lassen.

#### **6.4 Sequenzierungs-Elektrophorese**

1. Das Gel in den Sequenzierer (ALFexpress, Pharmacia Biotech) hängen, die Behälter am oberen und unteren Ende des Gels bis zur Markierung mit 1X TBE-Puffer füllen und behutsam den Kamm entfernen.
2. Die Taschen mit Puffer spülen, die Intensität des Lasers überprüfen und das Gerät für 15-30 min bei 34 W laufen lassen.
3. Gegebenenfalls die Proben in der Zwischenzeit durch zweiminütiges Erhitzen auf 90°C denaturieren und auf Eis stellen.
4. Die Taschen des Gels erneut mit Puffer spülen und die Proben in die nummerierten Taschen pipettieren (die Temperatur des Gels sollte etwa 50°C betragen).
5. Nach Überprüfung der Elektroden und der Laserintensität das Gel für 8-12 Stunden bei 34 W laufen lassen.
6. Anschließend die vom Gerät detektierten Banden mit Hilfe der Software (AM V3.02 auf dem OS/2 System) am Computer auswerten: Aus der Reihenfolge der Banden (Peaks), die die Basen Adenin, Cytosin, Guanin, Thymin repräsentieren, lässt sich die Sequenz des Gens erstellen.

## C Patientendaten

Die Etablierung eines Screeningverfahrens zur Mutationsanalyse in der molekulargenetischen Diagnostik des OTC-Mangels erforderte die Untersuchung verschiedener Patientenkollektive.

### 1 Validierung der DGGE-Analyse

Im Rahmen der Einführung der DGGE, dem ersten Teil der experimentellen Arbeit, wurden insgesamt 53 bereits typisierte DNA-Proben auf Mutationen im *OTC*-Gen untersucht. Die Proben erhielten wir von anderen Arbeitsgruppen, die meist als Screeningverfahren zur Mutationsanalyse eine SSCP- (Single Strand DNA Conformation Polymorphism) Analyse verwendeten oder die Proben vollständig sequenziert hatten.


Im ersten Schritt der Einführung der DGGE wurden zunächst 9 DNA-Proben (Nr. 1-9) analysiert. Die DNA sowie die in Tabelle II-3 dargestellten Informationen bezüglich des Überträger- bzw. Krankheitsstatus sowie die jeweilige Mutation, wurden uns durch Herrn Dr. Bakker / Leiden (Niederlanden) zur Verfügung gestellt.

**Tabelle II-3 Experiment 1 zur Validierung der DGGE-Analyse.** Die jeweiligen Mutationen in den DNA-Proben-Nr. 1-9 wurden mittels DGGE und exonspezifischer Sequenzierung detektiert.

Proben-Nr.	Exon / Intron	Mutation	
1	Exon 5	Arg141Gln	Carrier
2	Exon 6	Gly195Arg	Carrier
3	Exon 1	Arg23X	Patient
4	Exon 6	Ala209V	Carrier
5	Exon 6	Ala208Trp	Carrier
6	Exon 6	Asp196Asn	Patient
7	Exon 4	Arg129His	Patient
8	Exon 6	Ala208Trp	Patient
9	Exon 2	Met56Thr	Patient

Der zweite experimentelle Schritt befasste sich mit der DGGE-Analyse und Sequenzanalyse von 11 teils anonymisierten DNA-Proben (Nr. 10-20). Die DNA-Proben molekulargenetisch gesicherter OTC-Fälle erhielten wir von Herrn Dr. Santer / Kiel (Deutschland). Zur Verfügung gestellt wurden Daten zum Geschlecht, männlich/weiblich, sowie eine Liste von 11 Mutationen, die wir nach der Analyse den entsprechenden Proben zuordnen konnten.

**Tabelle II-4 Experiment 2 zur Validierung der DGGE-Analyse.** Die Detektion von den patientenspezifischen Mutationen in den DNA-Proben Nr.10-20 erfolgte durch DGGE-Analyse und anschließende Sequenzierung des entsprechenden Exons.

10	männlich		Exon 1	R26Q
11	männlich		Exon 2	W58X
12	weiblich		Intron 2/ Exon 3	Dupl11bp
13	weiblich		Exon 5	R141G
14	weiblich		Exon 5	R141X
15	männlich		Exon 5	L173P
16	männlich		Exon 5	L178M
17	weiblich		Exon 6	K210E
18	weiblich		Exon 6	A208T
19	weiblich		Exon 8	G269A
20	weiblich		Exon 10	T343K

Nach erfolgreichem Abschluss dieses experimentellen Schrittes, folgte die Untersuchung von 33 anonymisierten DNA-Proben (Nr. 21-53), welche uns durch Herrn Prof. Wermuth / Bern (Schweiz) zur Verfügung gestellt worden sind. Es standen lediglich Informationen hinsichtlich des Geschlechts zur Verfügung. Insgesamt waren es 25 DNA-Proben weiblichen sowie 8 DNA-Proben männlichen Geschlechts. Die Anonymisierung fand in Bezug auf die nachgewiesenen Mutationen in den Proben des zur Verfügung stellenden Institutes statt. Nach Vorliegen der Analyseergebnisse wurde die Anonymisierung aufgehoben und ein Ergebnisvergleich durchgeführt.

## 2 Prospektive Untersuchung bei Verdacht auf OTC-Mangel

Im Teil zwei der hier vorgelegten Arbeit wurde eine molekulargenetische Diagnostik bei 10 Familien mit der klinischen Fragestellung Verdacht auf OTC-Mangel (10 Indexpatienten und 15 Familienangehörigen) durchgeführt. Die zur Verfügung gestellten Angaben sind in Tab. II-5 zusammengefasst dargestellt. Bei einigen Patienten standen klinische Daten nur unvollständig zur Verfügung, so dass die Ergebnisse der molekulargenetischen Analyse nur unter Vorbehalt diskutiert werden können.

Ein biochemisch bzw. enzymatisch gesicherter OTC-Defekt lag lediglich bei Patient 60.1 sowie 61.1 vor. Drei klinische Fälle sollen besonders erwähnt werden.

**Tabelle II-5 Auflistung der Patienten bzw. Familien mit V.a. OTC-Mangel und Indikation zur Durchführung einer Molekulargenetischen Analyse des OTC-Gens.**

PROBEN-NR.	Geschlecht / Familienstatus	Zusammenfassung der Klinischen Angaben
54.1	Weibl. Pat., geb.1997	V.a. OTC-Mangel. Klinische Informationen liegen nicht vor.
54.2	Mutter, geb.1961	
55	Weibl. Pat., geb.1996	V.a. heterozygoten OTC-Mangel Klinische Informationen liegen nicht vor.
56.1	Weibl. Pat., geb.1998	V.a. OTC-Mangel. Siehe Text.
56.2	Mutter, geb.1965	
56.3	Vater	
57	Weibl. Pat., geb. 1996	V.a. OTC-Mangel bei Z.n. Schocksyndrom bei Sepsis. Pancytopenie, Embolische Hirninfarkte. Orotsäure im Urin erhöht. DD: H-H-H-Syndrom.
58	Männl. Pat., geb. 1950	V.a. OTC-Mangel bei rezidivierenden komatösen Zuständen nach Infektionen. Psychopatholog. auffällig i.S. eines Eifersuchtswahns.
59.1	Weibl. Pat., geb.1996	Hyperammonämie mit rezidivierenden Erbrechen, Somnolenz und intermittierender Ataxie. Erhöhung der Transaminasen zwischen 150-250 U/l, Quick 28%.
59.2	Mutter	
59.3	Vater	
59.4	Schwester von 59.1	Asymptomatisch.
60.1	Männl. Pat., geb. 1999, verstorben im Alter von 5 Tagen	Siehe Text.
60.2	Mutter	
60.3	Fetus	
60.4	Vater	
61.1	Männl. Pat., geb 1999	Anamnese: Hyperammonämie mit Enzephalopathie im Alter von 36 Stunden. Orotsäure stark erhöht, Citrullin nicht nachweisbar. Biochemisch gesicherter OTC-Mangel.
61.2	Mutter	
61.3	Schwester von 99-282	Late-onset Form des OTC-Mangels
62.1	Weibl. Pat., geb. 1996	Ungarische Patientin mit V.a. OTC-Mangel. Klinische Informationen liegen nicht vor.
62.2	Mutter	
62.3	Vater	

PROBEN-NR.	Geschlecht / Familienstatus	Zusammenfassung der Klinischen Angaben
63.1	Männl. Pat., geb. 2000	Siehe Text.
63.2	Mutter	
63.3	Vater	

**Indexpatient 56**

Bei der Patientin 56.1 trat in der zweiten Lebenswoche eine enzephalopatische Krise mit Hyperammonämie bis 400  $\mu\text{mol/l}$ , erhöhter Orotsäureausscheidung (3000  $\text{mmol/mol}$  Kreatinin) sowie nicht nachweisbaren Citrullin im Plasmaamino säureprofil auf. Es wurde die Verdachtsdiagnose eines heterozygoten OTC-Mangels gestellt. Ein im Verlauf durchgeführter Allopurinoltest war unauffällig, wie im übrigen auch bei der Mutter des Mädchens. Die Orotsäureausscheidung normalisierte sich im Verlauf. Unter einer mäßigen Eiweißrestriktion, oraler Substitution von Citrullin und Gabe von Natriumbenzoat, zeigten sich niedrige Ammoniakspiegel.

Eine Glutaminerhöhung konnte zu keinem Zeitpunkt nachgewiesen werden. Die in Bern durchgeführte SSCP-Analyse des *OTC*-Gens zeigte keinen Hinweis auf das Vorliegen einer Mutation.

**Indexpatient 60**

Der Patient 60.1 verstarb im Alter von 5 Tagen im hyperammonämischen Koma. Ein OTC-Mangel wurde durch eine vermehrte Orotsäureausscheidung im Urin vermutet und durch eine Leberbiopsie enzymatisch gesichert (Restaktivität von 5  $\mu\text{mol/min/mg}$  Protein). Als Untersuchungsmaterial bekamen wir DNA aus einer Leberbiopsie. Des weiteren erhielten wir Untersuchungsmaterial (DNA aus Vollblut) von der Mutter (60.2) und vom Vater (60.4) des Patienten. Anamnestisch gab es keine Hinweise auf Stoffwechselerkrankungen oder ungeklärte neonatale Todesfälle in der Familie. Ein bei der Mutter durchgeführter Allopurinoltest (siehe Tabelle II-6), zeigte eine grenzwertige Erhöhung von Orotidin und insbesondere der Orotsäure im Urin in  $\mu\text{mol/mmol}$  Kreatinin in Bezug auf die Referenzwerte von Hauser et al. (1990). Zusätzlich erhielten wir DNA aus einer bei der Mutter durchgeführten Chorionzottenbiopsie (CVS) zur Durchführung einer Mutationsanalyse des *OTC*-Gens im Rahmen einer pränatalen Diagnostik (Probe 60.3).

**Tabelle II-6 Ergebnisse des Allopurinoltest von der Probandin 60.2 (Mutter des Patienten 60.1).**

	Resultat	Referenzwerte in $\mu\text{mol}/\text{mmol}$ Kreatinin			Resultat	Referenzwerte in $\mu\text{mol}/\text{mmol}$ Kreatinin		
	<b>Orotsäure</b> ( $\mu\text{mol}/\text{mmol}$ Kreatinin)	<b>Orotsäure</b>			<b>Orotidin</b> ( $\mu\text{mol}/\text{mmol}$ Kreatinin)	<b>Orotidin</b>		
		Normale Frau	Obligat Heterozygot	Wahrscheinlich Heterozygot		Normale Frau	Obligat Heterozygot	Wahrscheinlich Heterozygot
<b>Nullwert</b>	1,80	<0,8	1,4 (<0,8-6,1)	1,3 (<0,8-6,0)	0,3	<0,8	0,8 (<0,8-1,6)	0,8 (<0,8-1,1)
<b>1.Periode</b> (0-6h)	15,3	4,1 (<0,8-14,2)	31,6 (2,94-194,5)	25,9 (3,4-66,0)	1,2	1,0 (<0,8-3,0)	4,8 (<0,8-30,7)	4,9 (<0,8-13,9)
<b>2.Periode</b> (7-12h)	10,8	5,4 (<0,8-12,6)	100,6 (2,4-384,0)	46,3 (2,6-231,0)	5,6	2,0 (<0,8-4,6)	27,2 (<0,8-118,5)	21,6 (3,2-49,8)
<b>3.Periode</b> (13-18h)	4,2	3,5 (<0,8-15,5)	65,9 (<0,8-329,9)	39,0 (<0,8-199,0)	5,3	3,0 (0,8-6,5)	28,2 (2,6-78,8)	31,2 (2,0-103,4)
<b>4.Periode</b> (19-24h)	4,8	2,1 (<0,8-7,6)	17,0 (<0,8-66,2)	15,1 (<0,8-65,7)	3,9	3,1 (<0,8-7,2)	20,9 (<0,8-63,4)	30,6 (<0,8-138,2)

**Indexpatient 63**

Im Alter von einem Jahr und 11 Monaten wurde bei dem männlichen Patienten die Verdachtsdiagnose OTC-Mangel gestellt, nachdem eine stationäre Aufnahme bei starker Unruhe, rezidivierenden Erbrechen und Somnolenz erfolgte. Laborchemisch wurden wegweisend eine Hyperammonämie mit Werten von  $273 \mu\text{mol}/\text{l}$  sowie eine massiv erhöhte Orotsäure im Urin gemessen. Des Weiteren wurde eine Erhöhung der Transaminasen, eine Gesamt-Bilirubinerhöhung und ein Quick von 63% festgestellt.

Die klinische Untersuchung ergab eine psychomotorische Entwicklungsverzögerung. Ein Schädel-MRT zeigte den klassischen Befund einer hyperammonämischen Enzephalopathie mit Hirnatrophie, fokalen Marklagerveränderungen frontal und okzipital und subcortikalen U-Fasern. Aus der Anamnese sind bedeutend: ein rezidivierend auftretender Ikterus, rezidivierende Unruhezustände und Erbrechen, eine Entwicklungsstörung sowie eine Abneigung gegen Fleisch und Milchprodukte. Differentialdiagnostisch wurden eine Hepatitis A, B oder C, eine hämolytische Anämie und eine Sphärozytose ausgeschlossen.

Nach Akuttherapie mit Glukose, Fettinfusion, parenteraler Gabe von Natriumbenzoat und Argininhydrochlorid, wurde eine Dauerbehandlung mit eiweißarmer Diät (Gesamteiweißzufuhr von  $1,5 \text{ g}/\text{kg KG}/\text{d}$ ), Supplementierung essentieller Aminosäuren, Natriumphenylbutyrat und Citrullin eingeleitet und eine Besserung des klinischen Bildes unter Normalisierung des Ammoniaks erzielt.

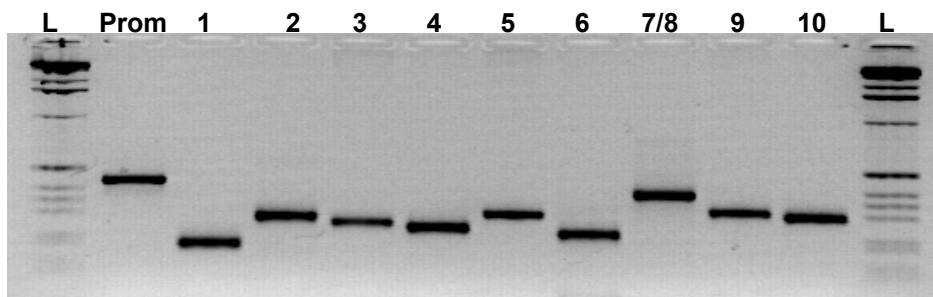
Die Mutationsanalyse erfolgte beim Patienten und den Eltern zunächst aus genomischer DNA aus Vollblut. Aufgrund des molekulargenetischen Befundes schloss sich eine Mutationsanalyse aus Fibroblasten sowie Lymphozyten und eine Karyotypisierung des Patienten an (Prof. G. Wolff, Institut für Humangenetik Freiburg).

Im weiteren Verlauf folgte im Alter von zwei Jahren und 6 Monaten eine stationäre Aufnahme aufgrund einer Stoffwechselentgleisung mit Hyperammonämie (bis maximal 485  $\mu\text{mol/l}$ ), erhöhter Glutaminkonzentration sowie erniedrigter Argininkonzentration im Plasma. Im Alter von 3 Jahren und 2 Monaten verstarb das Kind an den Folgen eines hyperammonämischen Komas bei akuter Gastroenteritis während eines Auslandsaufenthaltes. Trotz Ausschöpfung aller therapeutischer Möglichkeiten zur Behandlung der Hyperammonämie wurden Plasma-Ammoniakwerte bis 1200  $\mu\text{mol/l}$  gemessen. Ein MRT des Gehirns zeigte eine schwere akut toxische ödematöse Veränderung beider Großhirnhemisphären sowie subfalciale, uncale und transtentorielle Herniation mit beginnender Einklemmung des Hirnstammes. Familienanamnestisch gab es keine Hinweise auf ähnliche Fälle.

## KAPITEL III : ERGEBNISSE

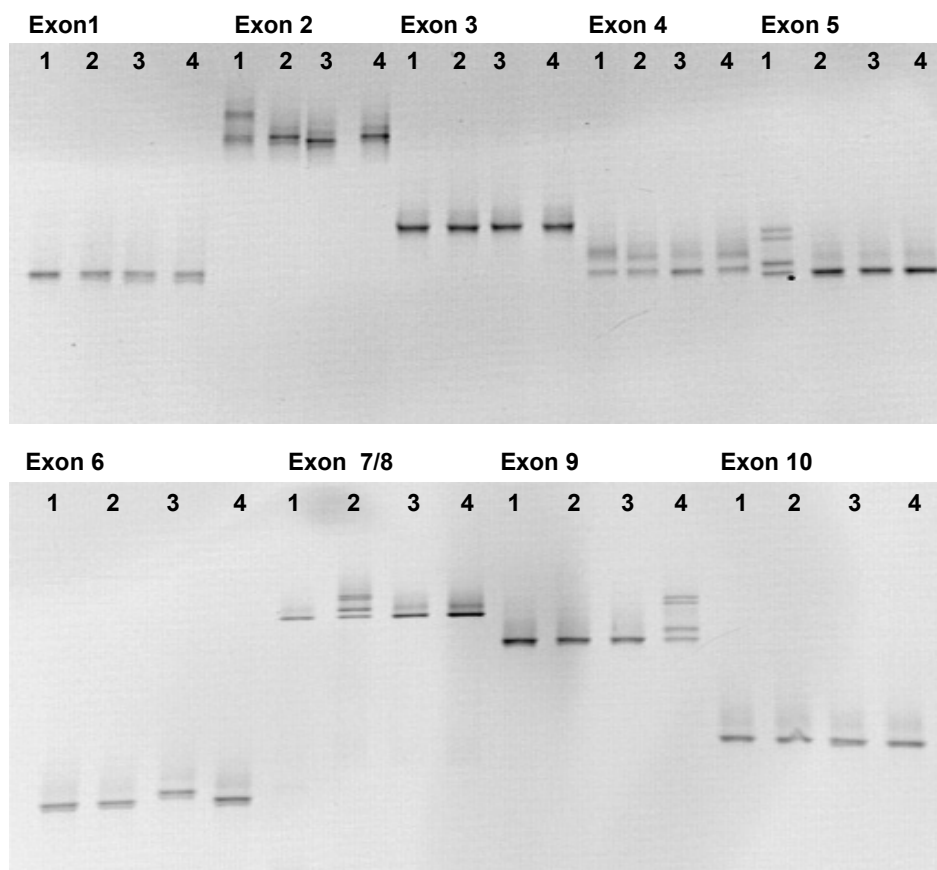
### A Übersicht

Im Rahmen der Etablierung der DGGE (*Denaturierungs-Gradienten-Gelelektrophorese*) als ein mögliches Screeningverfahren in der Routinediagnostik zur Mutationsanalyse im *OTC*-Gen, wurden zunächst bereits typisierte DNA-Proben aus 3 Patientenkollektiven analysiert. Die Mutationsanalyse der insgesamt 53 DNA-Proben bestand im Wesentlichen aus zwei Schritten: Analyse der gesamten kodierenden Region des *OTC*-Gens und angrenzender Intronabschnitte mittels DGGE und Identifikation zur genauen Charakterisierung einer detektierten Veränderung durch die exonspezifische Sequenzierung.



**Bild 3-1** Darstellung der PCR-Amplifikationsprodukte von Exon 1 bis Exon 10 sowie der Promotorregion für die Sequenzanalyse des *OTC*-Gens mittels Gelelektrophorese (Agarose). Die Exons sind von 1 bis 10 durchnummeriert. Prom: Promotorregion. L: Größenstandard (1 kb Leiter).





**Bild 3-2 DGGE-Analyse von Exon 1 bis Exon 5 sowie Exon 6 bis Exon 10 des OTC-Gens bei 4 Patienten mit nachgewiesener Mutation.** Patientin 1 hat einen Polymorphismus in Exon 2 (K46R) und eine Mutation in Exon 5 (R141Q). Patientin 2 ist heterozygot für eine Mutation in Exon 8 (R277W). Patient 3 ist hemizygot für einen Polymorphismus in Exon 2 (K46R) und eine Mutation in Exon 6 (A208T). Patientin 4 hat eine heterozygote Mutation in Exon 9 (W332X). DGGE erfolgte bei 180V, 58°C im Puffertank und einer Laufzeit von 6 Stunden.

Die Ergebnisse bei allen Proben stimmten mit der vorausgegangenen Typisierung überein.

Bei 45 der 53 DNA-Proben wurden Mutationen in Übereinstimmung mit den Vorbefunden nachgewiesen. Bei den Proben Nr. 1-9 wurden alle vorgegebenen Mutationen mittels DGGE erkannt. Bei den Proben Nr. 10-20 konnten Mutationen in Übereinstimmung mit den vorgegebenen Ergebnissen der verschiedenen Patienten zugeordnet werden. In den Proben Nr. 21-53 konnten wir bei 8 von 33 Proben keine Mutation nachweisen; dieses Analyseergebnis deckte sich mit den Ergebnissen der Schweizer Arbeitsgruppe. In Tabelle III-1 sind die nachgewiesenen Varianten zusammenfassend aufgeführt und in Kapitel III-B als Abbildungen zu sehen.

**Tabelle III-1 Tabellarische Auflistung aller entdeckten Mutationen in aufsteigender Reihenfolge im OTC-Gen.** Nonsense Mutation bedeutet, Austausch einer Aminosäure gegen STOP Codon. Missense Mutation bedeutet, Aminosäureaustausch chemisch verwandter Aminosäuren (konservativ) bzw. deutlich unterschiedlicher Seitenketten. Frameshift bedeutet, Leserasterverschiebung.

Lokalisation im OTC-Gen	cDNA-Name / -Trivialname-	Mutation Hemizygot (M●) bzw. Heterozygot (MN) nachweisbar	Funktionelle Auswirkung
<i>Promotor</i>	-176C>G	M● / MN	
<i>Exon 1</i>	c.67C>T R23X	M● / MN	Nonsense Mutation, CpG Dinukleotid
	c.77G>A R26Q	MN	CpG Dinukleotid, Splice site
<i>Intron 1</i>	IVS1+1g>t	MN	Donorsplicesite
<i>Exon 2</i>	c.119G>A R40H	M●	Missense Mutation, CpG Dinukleotid
	c.127C>T L43F	MN	Missense Mutation
	c.137A>G K46R	M● / MN	Polymorphismus
	c.167T>C M56T	M●	Missense Mutation
	c.173G>A W58X	MN	Nonsense Mutation
<i>Intron 2/ Exon 3</i>	c.217_218insTTGATTATAG Y73fsins11bp		Frameshift
<i>Exon 3</i>	c.238A>G K80E	MN	Missense Mutation
<i>Intron 3</i>	IVS3-8a>t		Polymorphismus
<i>Exon 4</i>	c.299G>A G100D	MN	Missense Mutation
	c.303A>T F101L		Polymorphismus
	c.386G>A R129H	M●	CpG Dinukleotid, Donor splice site
<i>Intron 4</i>	IVS4-7a>g		Polymorphismus
<i>Exon 5</i>	c.410C>G A137G	M● / MN	Missense Mutation, konservativ
	c.417_418insTATTG	M● / MN	Frameshift
	c.421C>G R141G	MN	Missense Mutation

Lokalisation im OTC-Gen	cDNA-Name / -Trivialname-	Mutation Hemizygot (M●) bzw. Heterozygot (MN) nachweisbar	Funktionelle Auswirkung
	c.421C>T R141X	MN	Nonsense Mutation, CpG Dinukleotid
	c.422G>A R141Q	MN	Missense Mutation, CpG Dinukleotid
	c.518T>C L173P	MN	Missense Mutation
	c.533C>T T178M	M●	Missense Mutation
	c.540G>C Q180H	MN	Donor splice site
<b>Intron 5</b>	IVS5+1g>a	MN	Donor splice site
<b>Exon 6</b>	c.548A>G Y183C	MN	Missense Mutation
	c.583G>A G195R	MN	Missense Mutation, CpG Dinukleotid
	c.586G>A D196N	M●	Missense Mutation
	c.588T>A D196E	M● / MN	Missense Mutation, konservativ
	c.605A>C H202P	MN	Missense Mutation
	c.608_609insTC		Frameshift
	c.622G>A A208T	M● / MN	Missense Mutation, CpG Dinukleotid
	c.626C>T A209V	MN	Missense Mutation, konservativ
	c.628A>G K210E	M●	Missense Mutation
<b>Exon 7</b>	c.674C>T P225L	M● / MN	Missense Mutation
	c.717G>T E239D	MN	Spleißmutation
<b>Intron 7</b>	IVS7-14t>c		Polymorphismus
<b>Exon 8</b>	c.727_730delAAGC		Frameshift
	c.787G>A D263N	MN	Missense Mutation
	c.805G>A G269R	M●	Missense Mutation

Lokalisation im OTC-Gen	cDNA-Name / -Trivialname-	Mutation Hemizygot (M●) bzw. Heterozygot (MN) nachweisbar	Funktionelle Auswirkung
	c.809A>G Q270R		Polymorphismus
	c.829C>T R277W	M● / MN	Missense Mutation, CpG Dinukleotid
<b>Exon 9</b>	c.894G>A W298X	MN	Nonsense Mutation
	c.996G>A W332X	M● / MN	Nonsense Mutation
<b>Intron 9</b>	IVS9-12g>t		Polymorphismus
<b>Exon 10</b>	c.1028C>A T343K	M●	Missense Mutation
	c.1064G>T X355L	MN	Missense Mutation

Im zweiten Abschnitt der vorliegenden Arbeit führten wir bei 10 Patienten mit Verdacht auf OTC-Mangel sowie 15 Familienangehörigen eine molekulargenetische Diagnostik durch. Die Analyse der gesamten kodierenden Region des *OTC*-Gens und angrenzender Intronabschnitte erfolgte auch hier im ersten Schritt bei allen Patienten und Familienangehörigen mittels DGGE als Screeningverfahren. Anschließend nutzten wir zur Identifikation der genauen Veränderung die exonspezifische Sequenzierung. Konnten wir bei hinreichendem klinischen bzw. biochemischen Verdacht auf OTC-Mangel in der DGGE keinen Hinweis auf das Vorliegen einer genetischen Veränderung finden, schlossen wir die Sequenzanalyse der gesamten kodierenden Region des *OTC*-Gens und angrenzender Intronabschnitte sowie der 5'-nicht-translierten Region an.

Bei insgesamt 6 der 10 Patienten gelang trotz dieser eingehenden Mutationsanalyse kein Nachweis einer potentiell krankheitsverursachenden Mutation. Bei zwei dieser 6 Patienten, Indexpatienten Nr. 54 und Nr. 55, standen uns keine klinischen und biochemischen Angaben bzgl. der Verdachtsdiagnose OTC-Mangel zur Verfügung. Bei 3 Patienten war das klinische Bild untypisch für einen OTC-Mangel (Nr. 56, Nr. 57, Nr. 58). Bei Indexpatient Nr. 60 konnten wir trotz enzymatischer Sicherung der Diagnose die potentiell verantwortliche Mutation nicht detektieren.

Allerdings zeigte die Sequenzanalyse der Promotorregion eine Sequenzvariante, deren Bedeutung nur spekulativ beurteilt werden kann.

Bei 4 der 10 Patienten konnten wir die potentiell krankheitsverursachende Mutation nachweisen (Patient Nr. 59, Nr. 61, Nr. 62, Nr. 63).

Die Ergebnisse sind in Tab.III-1 integriert. Die Analyseergebnisse der jeweiligen Patienten sind in Kapitel III-C aufgeführt.

## B Darstellung der Analyseergebnisse

Bei der Mutationsanalyse der 53 DNA-Proben wurden mittels DGGE insgesamt 36 unterschiedliche Mutationen nachgewiesen. Davon waren 24 Missense-Mutationen, 5 Nonsense-Mutationen, 4 Donorsplicesite-Mutationen sowie 2 Insertionen und 1 Deletion. Fünf Mutationen (D196E, A208T, P225L, R277W, W332X) wurden sowohl heterozygot als auch hemizygot nachgewiesen.

Im folgenden sind die Analyseergebnisse der DGGE und die entsprechenden Sequenzierergebnisse für die unterschiedlichen Mutationen in den DNA-Proben Nr. 1-53 aufgeführt. Jede Mutation ist jeweils durch einen Ausschnitt der DGGE und einen Auszug der relevanten Sequenz dargestellt. Die verwendeten Abkürzungen stehen für:

- N** -Wildtyp;
- M●** -Mutation, hemizygot;
- MN** -Mutation, heterozygot;
- PN** -Polymorphismus, heterozygot;
- P●** -Polymorphismus, hemizygot;
- M+** -gemischte Probe (gesunder hemizygoter Mann + potentiell erkrankter hemizygoter Mann);
- MP** -Mutation und Polymorphismus in *trans*;
- MP/N** -Mutation und Polymorphismus in *cis*; Wildtyp auf anderem Chromosom
- MP/P** -Mutation und Polymorphismus in *cis* u. Polymorphismus auf anderem Allel

### EXON 1 / Intron 1

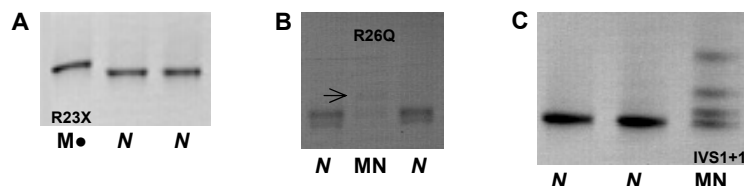
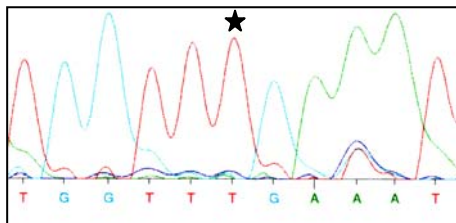


Bild 3-3 Ergebnisse der DGGE-Analyse Exon1.

A: Darstellung der Mutation R23X (*hemizygot*). B: Darstellung der Mutation R26Q (*heterozygot*). C: Darstellung der Mutation IVS1+1g>t (*heterozygot*) in Intron 1.

Die Mutation R23X (c.67C>T) konnte hemizygot in der DGGE-Analyse (Bild 3-3A) durch das Auftreten einer Homoduplexbande (M●), welche sich durch die Position im Gel deutlich von der Wildtypbande abgrenzen ließ, nachgewiesen werden. In der DGGE-Analyse (Bild 3-3B) der weiblichen Patientin Nr. 19 ließ sich nur in Exon 1 ein vom Wildtyp abweichendes Bandenmuster abgrenzen (in der direkten Betrachtung besser sichtbar; aufgrund einer vermutlich zu geringen DNA-Konzentration der Probe war die Auswertung der DGGE-Analyse erschwert). Die Mutation IVS1+1g>t im Intron 1 zeigte sich in der DGGE-Analyse durch das Auftreten von 2 Homoduplexbanden und 2 Heteroduplexbanden (MN). In Bild 3-3C kann man eine Homoduplexbande in Höhe der Wildtypbanden (N) und eine weitere oberhalb dieser erkennen. Das würde einem vorhandenen Wildtyp-Allel und einem mutanten Allel entsprechen. Die Mutation ist daher auch hemizygot nachweisbar.

#### R23X / c.67C>T

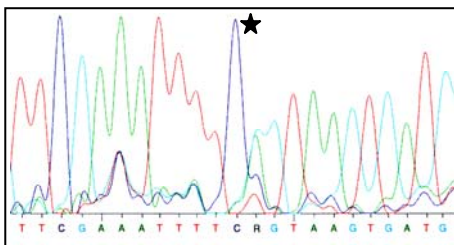


**Bild 3-4 Sequenzanalyse der Mutation R23X (hemizygot).**

eine sogenannte Nonsense-Mutation (Austausch einer Aminosäure gegen ein Stopcodon). Abbildung 3-4 zeigt das Sequenzierungsergebnis bei einem hemizygoten Knaben.

Bei der Mutation R23X verändert die Substitution der Base Cytosin durch Thymin an cDNA-Position 67 des *OTC*-Gens das Codon Nr. 23, welches für die Aminosäure Arginin (CGA) kodierte, zu einem Stopcodon (TGA). Es handelt sich in diesem Fall um

#### R26Q / c.77G>A

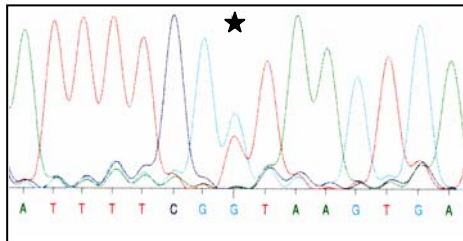


**Bild 3-5 Sequenzanalyse der Mutation R26Q (heterozygot).**

Die Mutation R26Q wurde in der Sequenzanalyse bei Patientin 19 heterozygot nachgewiesen (Bild 3-5). Die Substitution der Base G durch A an cDNA-Position 77 des *OTC*-Gens betrifft das letzte Nukleotid von Exon 1.

Das Codon Nr. 26 kodiert nun nicht mehr für die Aminosäure Arginin (CGG) sondern für Glutamin (CAG); wahrscheinlich wird aber auch das korrekte Spleißen von Exon 1 gestört.

#### IVS1+1g>t

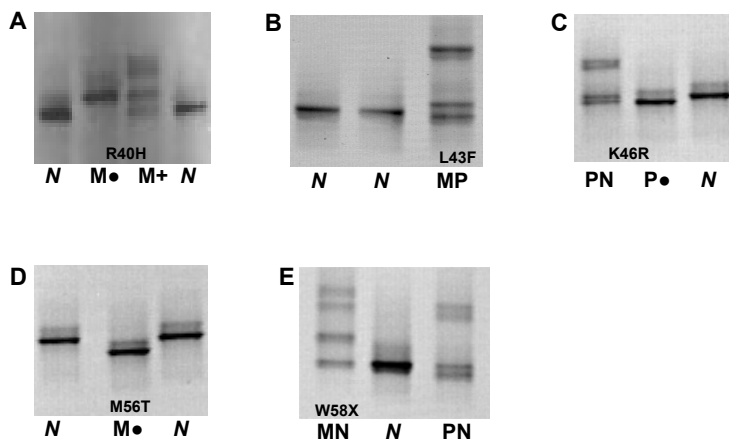


**Bild 3-6** Sequenzanalyse der Mutation IVS1+1g>t (heterozygot) in Intron 1 des OTC-Gens.

In der Sequenzanalyse von Exon 1 ist diese Mutation als Substitution der Base Guanin durch Thymin in der Splice-Donor-Stelle (erste Base im Intronbereich) in Intron 1 identifiziert worden (Bild 3-6).

Es ist anzunehmen, dass sie das korrekte Spleißen von Exon 1 verhindert.

#### EXON 2



**Bild 3-7** Ergebnisse der DGGE-Analyse Exon 2.

**A:** Darstellung der Mutation R40H (*M*-hemizygot und in gemischter Probe *M*+).

**B:** Darstellung der Mutation L43F und des Polymorphismus K46R (*heterozygot*).

**C:** Darstellung des Polymorphismus K46R (*PN*- heterozygot, *P*-hemizygot).

**D:** Darstellung der Mutation M56T (*M*-hemizygot).

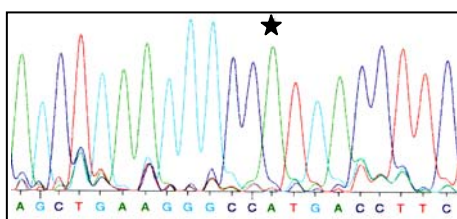
**E:** Darstellung der Mutation W58X (*MN*-heterozygot) sowie des Polymorphismus K46R (*PN*-heterozygot).

Die Mutation R40H (c.119G>A) fanden wir bei einem männlichen Patienten in der DGGE-Analyse (Bild 3-7A) als einzelne Homoduplexbande (*M*•) oberhalb der dem Wildtyp entsprechenden Bande (*N*). Das bei einem für die Mutation heterozygoten



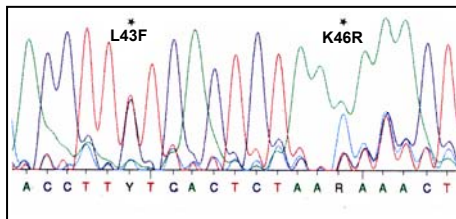
Patienten zu erwartende Bandenmuster, haben wir durch Mischung einer Wildtyp-DNA-Probe mit der für die Mutation hemizygoten DNA-Probe erzeugt (M+). In der DGGE-Analyse der weiblichen Patientin Nr. 23 fand sich abweichend von der Wildtypbande (N) eine heterozygot erscheinende DNA-Veränderung (MP), die in der Sequenzanalyse als Mutation L43F (c.127C>T) und Polymorphismus K46R (c.137A>G) identifiziert wurde. In Bild 3-7B können in MP die Homoduplexe leicht von der Heteroduplexbande unterschieden werden. Man erkennt, dass sich keine der Homoduplexbanden auf Höhe der Wildtypbanden (N) befindet. Im Vergleich mit der Wildtyp-Homoduplex arretiert der Polymorphismus-Homoduplex niedriger und der Mutations-Homoduplex im Gel höher. Daraus lässt sich schlussfolgern, Mutation und Polymorphismus befinden sich in trans, d.h. auf zwei verschiedenen Allelen. In Bild 3-7C ist der Polymorphismus K46R (c.137A>G) in heterozygoter und hemizygoter Form dargestellt. Vergleicht man PN und P●, sieht man bei PN neben einer Homoduplexbande, die P● entspricht, eine weitere Homoduplexbande, die der Wildtypbande entspricht. Die Mutation M56T (c.167T>C) wurde bei dem männlichen Patienten Nr. 9 hemizygot als eine unterhalb der dem Wildtyp entsprechenden Bande (N) nachgewiesen (Bild 3-7D). Bei der weiblichen Patientin Nr. 12 zeigte sich in der DGGE-Analyse (Bild 3-7E) durch das Auftreten von 2 Homoduplexbanden und 2 Heteroduplexbanden eine heterozygot erscheinende Variante, welche in der Sequenzanalyse als Mutation W58X (c.173G>A) identifiziert wurde.

#### R40H / c.119G>A



**Bild 3-8 Sequenzanalyse der Mutation R40H (hemizygot) in Exon 2 des OTC-Gens.**

In der Sequenzanalyse wurde die Mutation hemizygot durch Substitution der Base G durch A an cDNA-Position 119 nachgewiesen. Somit kodiert das Codon Nr. 40 nicht mehr für die Aminosäure Arginin (CGT) sondern für Histidin (CAT). Die Mutation betrifft ein CpG-Dinukleotid.

**L43F / c.127C>T**

**Bild 3-9 Sequenzanalyse der Mutation L43F und des Polymorphismus K46R (heterozygot) in Exon 2 des *OTC*-Gens.**

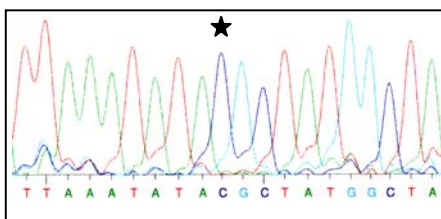
Die Substitution der Base C durch T an cDNA-Position 127 bedingt die Mutation L43F (heterozygot). Der Polymorphismus K46R besteht in der Substitution der Base A durch G bei cDNA-Position 137 (heterozygot).

**K46R / c.137A>G**

Bei der Mutation K46R handelt es sich um einen Polymorphismus in Exon 2 des *OTC*-Gens, der mit einer Allelfrequenz von 64% auftritt (Grompe *et al.* 1989). Die Substitution der Base A durch G bei cDNA-Position 137 des *OTC*-Gens bedingt die Mutation K46R.

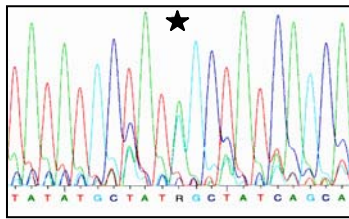


**Bild 3-10 Sequenzanalyse des Polymorphismus K46R in Exon 2 des *OTC*-Gens.**  
A. Heterozygot B. Hemizygot.

**M56T / c.167T>C**

**Bild 3-11 Sequenzanalyse der Mutation M56T (hemizygot) in Exon 2 des *OTC*-Gens.**

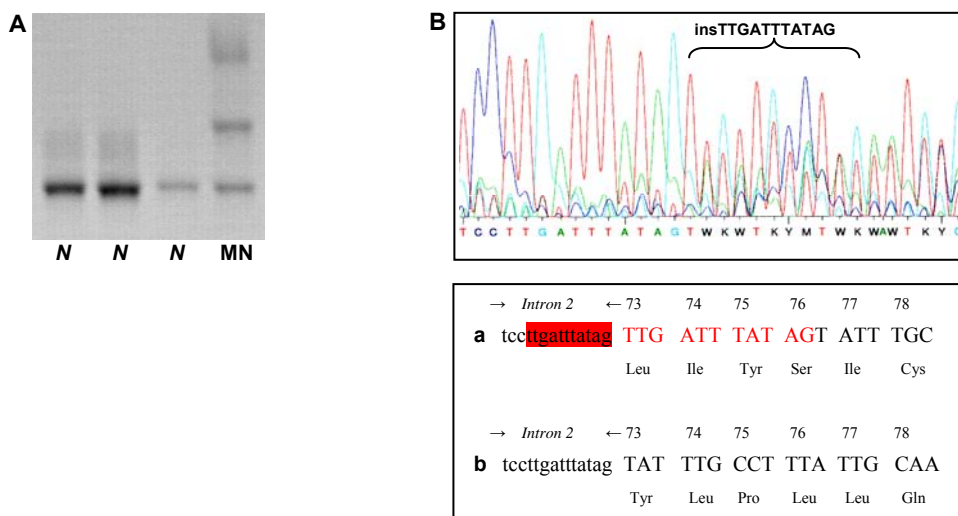
In der Sequenzanalyse wurde die Mutation hemizygot durch Substitution der Base T durch C an cDNA-Position 167 nachgewiesen.

**W58X / c.173G>A**

**Bild 3-12 Sequenzanalyse der Mutation W58X (heterozygot) in Exon 2 des *OTC*-Gens.**

In der Sequenzanalyse wurde die Mutation W58X bei der Patientin Nr. 12 heterozygot identifiziert.

Die Substitution der Base G durch A an cDNA-Position 173 des *OTC*-Gens verändert das Codon Nr. 58, welches für die Aminosäure Tryptophan (TGG) kodierte zu einem STOP-Codon (TAG).

**Intron 2 / Exon 3**

**Bild 3-13 Darstellung der Duplikation c.217-10\_217dup am Beginn von Exon 3 des *OTC*-Gens.**

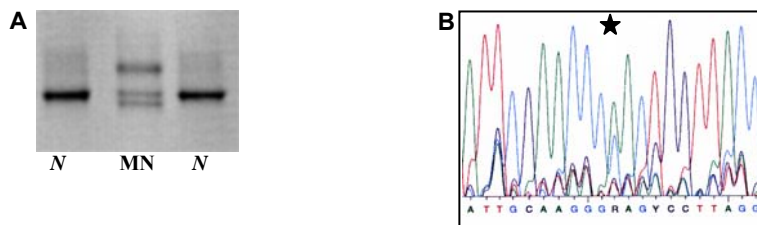
**A: DGGE-Analyse. B: Sequenzanalyse:** a: Die Duplikation der letzten 11 Nukleotide von Intron 2 führt vermutlich zu einer Verschiebung des Leserasters ab Codon Nr. 73, sodass eine veränderte Abfolge der Aminosäuren resultiert. b: Kontrollsequenz.

**Insertion zwischen 2 benachbarten Nukleotiden /  
c.217\_218insTTGATTATAG oder Y73fsins11bp**

In der DGGE-Analyse von Exon 3 detektierten wir bei der weiblichen Patientin Nr. 20 eine vom Wildtyp (N) abweichende DNA-Veränderung (MN) in Form von drei Banden. In der sich anschließenden Sequenzanalyse konnte diese Mutation als Insertion von 11 Basenpaaren identifiziert werden (siehe Bild 3-13B). Dabei findet eine Duplikation der letzten 11 Basenpaare (Bild 3-13B-a: rote Markierung) von Intron 2 statt. Es ist anzunehmen, dass die erste der beiden potentiellen Splice-Akzeptorsequenzen zum Spleißen vom Intron verwendet wird und in der Folge es zu einer Insertion zusätzlicher Aminosäuren mit Verschiebung des Leserasters kommt. Deletionen, Insertionen oder Duplikationen nehmen im Vergleich zu Punktmutationen einen geringen Anteil ein.

Sie zeigen in der DGGE-Analyse meist einen großen Abstand zwischen Homo- und Heteroduplexbanden.

### Exon 3



**Bild 3-14 Darstellung der Mutation K80E (heterozygot) in Exon 3 des OTC-Gens.**

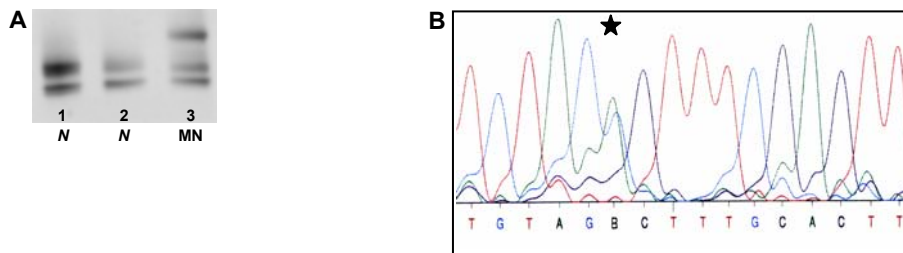
**A: DGGE-Analyse. B: Sequenzanalyse:** Substitution der Base A durch G an cDNA-Position 238 des OTC-Gens.

#### K80E / c.238A>G

Diese Mutation konnte heterozygot in der DGGE-Analyse durch das Auftreten von zwei Homoduplexbanden und eines Heteroduplexes nachgewiesen werden. In Bild 3-14A erkennt man bei MN eine Homoduplexbande übereinstimmend mit der Wildtypbande, eine weitere Bande unterhalb der Wildtypbande sowie einen Heteroduplex oberhalb der Wildtypbande. In der Sequenzanalyse von Exon 3 zeigte sich die Substitution der Base Adenin durch Guanin bei cDNA-Position 238, wodurch Codon Nr. 80 nicht mehr für Lysin (AAG) sondern für Glutamat (GAG) kodiert.

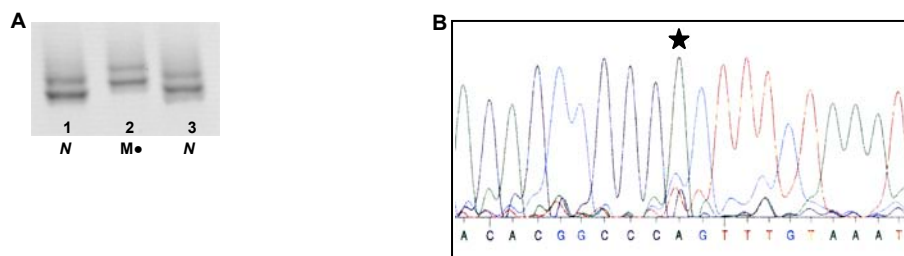
### Exon 4

Die Auswertung der DGGE-Analyse von Exon 4 des OTC-Gens gestaltete sich durch das konstante Auftreten einer unspezifischen zusätzlichen Bande schwierig. Eine Optimierung der Ergebnisse wäre wahrscheinlich durch ein verbessertes Primerdesign zu erreichen. Die Schmelztemperaturkurve (siehe Seite 50-Kapitel II-B) der von uns verwendeten Primer für Exon 4 zeigt im 5'-Bereich der untersuchten Sequenz eine Absenkung der Schmelztemperatur unter 70°C. Ein geradliniger Verlauf der Kurve wäre für optimale Ausgangsbedingungen wünschenswert. Nichtsdestotrotz konnten wir in der DGGE-Analyse alle untersuchten DNA-Veränderungen detektieren.



**Bild 3-15 Darstellung der Mutation G100D (heterozygot) in Exon 4 des OTC-Gens.**

**A: DGGE-Analyse. B: Sequenzanalyse:** Die Sequenzanalyse der Patienten in Spur 1 und 2 ergab einen Wildtyp in Exon 4. Die Substitution der Base G durch A an cDNA-Position 299 bedingt die Mutation G100D (heterozygot) und führt zur Umwandlung des Codons GGC in das Codon GAC.



**Bild 3-16 Darstellung der Mutation R129H (hemizygot) in Exon 4 des OTC-Gens.**

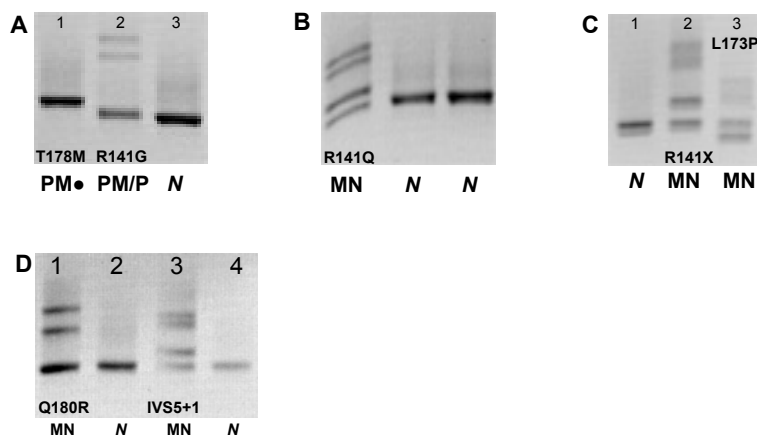
**A: DGGE-Analyse.** In Spur 2 kann man eine DNA-Veränderung erkennen, welche sich von Spur 1 und 3 durch die Höhe der Homoduplexbande unterscheidet. **B: Sequenzanalyse:** Die Sequenzanalyse der Patienten in Spur 1 und 3 ergab einen Wildtyp in Exon 4. Die Substitution der Base G durch A an cDNA-Position 386 bedingt die Mutation R129H (hemizygot) und führt zur Umwandlung des Codons CGT in das Codon CAT.

#### **G100D / c.299G>A**

Bei der weiblichen Patientin Nr. 25 detektierten wir in der DGGE-Analyse von Exon 4 eine Variante (MN in Bild 3-15A), die in der Sequenzanalyse als Mutation G100D (heterozygot) identifiziert wurde.

#### **R129H / c.386G>A**

In der DGGE-Analyse (Bild 3-16A) von Patient Nr.7 detektierten wir eine hemizygot DNA-Veränderung (M•), welche in der Sequenzanalyse (Bild 3-16B) als Mutation R129H identifiziert wurde. Diese Mutation haben wir nochmals bei dem männlichen Patienten Nr. 32 mittels DGGE-Analyse und direkter Sequenzierung identifiziert. Die Mutation betrifft ein hypermutagenes CpG-Dinukleotid, was das mehrfache unabhängige Auftreten erklärt. c.386.G>A betrifft das letzte Nukleotid von Exon 4 und stört vermutlich auch das direkte Spleißen.

**Exon 5****Bild 3-17 Ergebnisse der DGGE Analyse Exon 5.**

**A:** Darstellung der Mutation R141G (*heterozygot*) und T178M (*hemizygot*). Demonstration einer hemizygoten und heterozygoten DNA-Veränderung im Vergleich zum Wildtyp (N): Spur 1, für Mutation und Polymorphismus hemizygoter männlicher Patient (Nr. 16); Spur 2, für Mutation heterozygote und Polymorphismus homozygote weibliche Patientin (Nr. 17); Spur 3, Wildtyp.

**B:** Darstellung der Mutation R141Q mit dem Polymorphismus IVS4-7a>g.

**C:** Darstellung der Mutation R141X (Spur2) und der Mutation L173P (Spur3) zusammen mit dem Polymorphismus IVS4-7a>g (homozygot).

**D:** Darstellung der Mutation Q180H (*heterozygot*) in Exon 5 sowie IVS5+1g>c (*heterozygot*).

Der Ausschnitt der DGGE Analyse von Exon 5 in Bild 3-17A zeigt in Spur 1 eine deutlich vom Wildtyp (N) abgrenzbaren Homoduplexbande. Die Sequenzanalyse ergab ein hemizygoten Allel mit der Mutation T178M (c.533C>T) und dem Polymorphismus IVS4-7a>g. In der DGGE Analyse war nicht erkennbar, dass neben der Mutation zusätzlich noch ein Polymorphismus vorliegt.

In Spur 2 in Bild 3-17A erkennt man eine heterozygot erscheinende DNA-Veränderung, die in der Sequenzanalyse heterozygot als Mutation R141G (c.421C>G) und homozygot als Polymorphismus IVS4-7a>g identifiziert wurde. Schon durch die DGGE-Analyse ist erkennbar, dass es sich nicht nur um eine Mutation in Exon 5 handelt, da sich die aus zwei unterschiedlichen Allelen zusammengesetzte Homoduplexbande nicht auf Höhe der Wildtypbande befindet. Ein Wildtypallel liegt also nicht vor. Bei der weiblichen Patientin befindet sich auf einem Allel die Mutation R141G und der Polymorphismus, auf dem zweiten Allel allein der Polymorphismus IVS4-7a>g.

In der DGGE-Analyse fand sich bei zwei weiblichen Patientinnen (Nr. 1 und Nr. 37) das gleiche Bandenmuster mit zwei Homoduplexen und zwei Heteroduplexen (Bild 3-17B). In der sich anschließenden Sequenzanalyse von Exon 5 wurde in beiden Fällen neben der heterozygot vorliegenden Mutation R141Q (c.422G>A), homozygot der Polymorphismus IVS4-7a>g identifiziert.

Bei der weiblichen Patientin Nr. 13 (Bild 3-17C Spur 2) lassen sich zwei Homoduplexbanden von zwei Heteroduplexbanden abgrenzen. In der Sequenzanalyse erwies sich die heterozygot erscheinende DNA-Veränderung als Mutation R141X (c.421C>T) im Heterozygotenstatus und homozygot vorliegender Polymorphismus IVS4-7a>g.

Zusammengefasst kann man feststellen, dass sich die drei detektierten Mutationen im Codon 141 anhand des Bandenmusters in der DGGE-Analyse voneinander unterscheiden lassen.

Bei der weiblichen Patientin Nr. 14 (Bild 3-17C Spur 3) erkennt man zwei Homoduplexbanden, eine unterhalb der Wildtypbande und eine auf Höhe der Wildtypbande, und zwei etwas abgeschwächte Heteroduplexbanden. Im Vergleich mit den Bandenmustern der anderen Mutationen ist das Auftreten einer Homoduplexbande unterhalb der Wildtypbande auffallend.

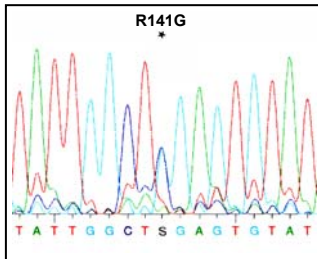
In der DGGE-Analyse (Bild 3-17D) der beiden weiblichen Patientinnen Nr. 27 (Spur 1) und Nr. 29 (Spur 3) detektierten wir jeweils heterozygot erscheinende DNA-Veränderungen. In Spur 1 sind neben einer Homoduplexbande zwei Heteroduplexbanden erkennbar, während in Spur 3 jeweils zwei Homoduplex- und Heteroduplexbanden erkennbar sind. In beiden Fällen wurde in der anschließenden Sequenzanalyse neben einer heterozygoten Mutation der Polymorphismus IVS4-7a>g homozygot nachgewiesen.

Der Polymorphismus IVS4-7a>g konnte in der Sequenzanalyse der Proben mit auffälligem Bandenmuster in Exon 5 der DGGE-Analyse identifiziert werden. Ob diese Variante auch bei den in der DGGE als Wildtyp interpretierten Banden vorhanden ist, wurde nicht in jedem Fall geklärt. Die Sequenzanalyse einer solchen einem Wildtyp interpretierten Bande (Probe Nr. 35) ergab den Polymorphismus in homozygoter Form. Nach Matsuura et al. tritt der Polymorphismus mit einer Allelhäufigkeit von 29% auf (Matsuura *et al.* 1993).

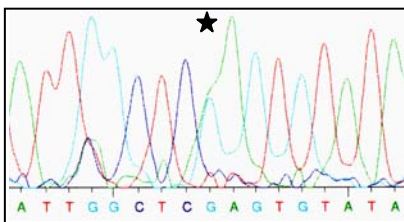


**R141G / c.421C>G**

In einer Untersuchung von McCullough et al. wurde gezeigt, dass nur wenige Mutationen wiederholt auftreten. Mutationen im Codon 141 werden jedoch wiederholt beobachtet. Codon Nr. 141 ist ein CpG-Dinukleotid, was vermutlich die höhere Mutationsrate bedingt (McCullogh *et al.* 2000). Bei der Mutation R141G findet eine Substitution der Base C durch G an cDNA-Position 421 der genomischen DNA statt.

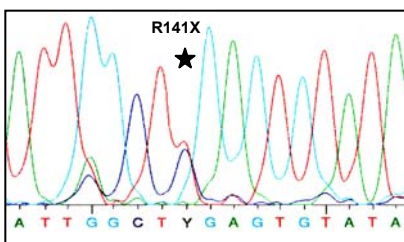


**Bild 3-18 Sequenzanalyse der Mutation R141G (heterozygot) in Exon 5 des OTC-Gens.**

**R141Q / c.422G>A**

**Bild 3-19 Sequenzanalyse der Mutation R141Q (heterozygot) in Exon 5 des OTC-Gens.**

In der Sequenzanalyse von Exon 5 der weiblichen Patientinnen Nr. 1 und Nr. 37 wurde neben der heterozygot vorliegenden Mutation R141Q, homozygot der Polymorphismus IVS4-7a>g identifiziert. Die Substitution der Base G durch A an cDNA-Position 422 bedingt die Mutation R141Q (heterozygot) und führt zur Umwandlung des Codons CGA in das Codon CAA.

**R141X / c.421C>T**

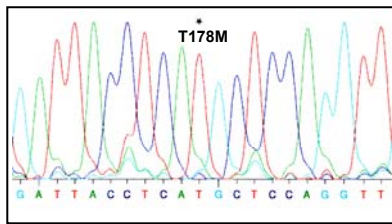
**Bild 3-20 Sequenzanalyse der Mutation R141X (heterozygot) in Exon 5 des OTC-Gens.**

Die Substitution der Base C durch T an cDNA-Position 421 bedingt die Mutation R141X (heterozygot) und führt zur Umwandlung des Codons CGA in das Stopcodon TGA.

**L173P / c.518T>C**

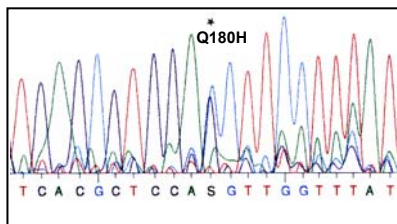
Bei der weiblichen Patientin Nr. 14 wurde in der Sequenzanalyse die Mutation L173P heterozygot und der Polymorphismus IVS4-7a>g homozygot identifiziert (Sequenzanalyse nicht abgebildet). Die Mutation L173P entsteht durch Substitution der Base T durch C an cDNA-Position 518.



**T178M / c.533C>T**

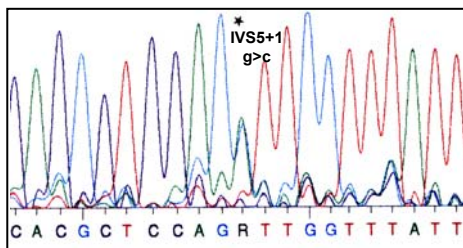
**Bild 3-21 Sequenzanalyse der Mutation T178M (hemizygot) in Exon 5 des *OTC*-Gens.**

Bei dem männlichen Patienten Nr. 16 wurde hemizygot die Mutation T178M nachgewiesen. Die Mutation T178M entsteht durch Substitution der Base C durch T an cDNA-Position 533 des *OTC*-Gens.

**Q180H / c.540G>C**

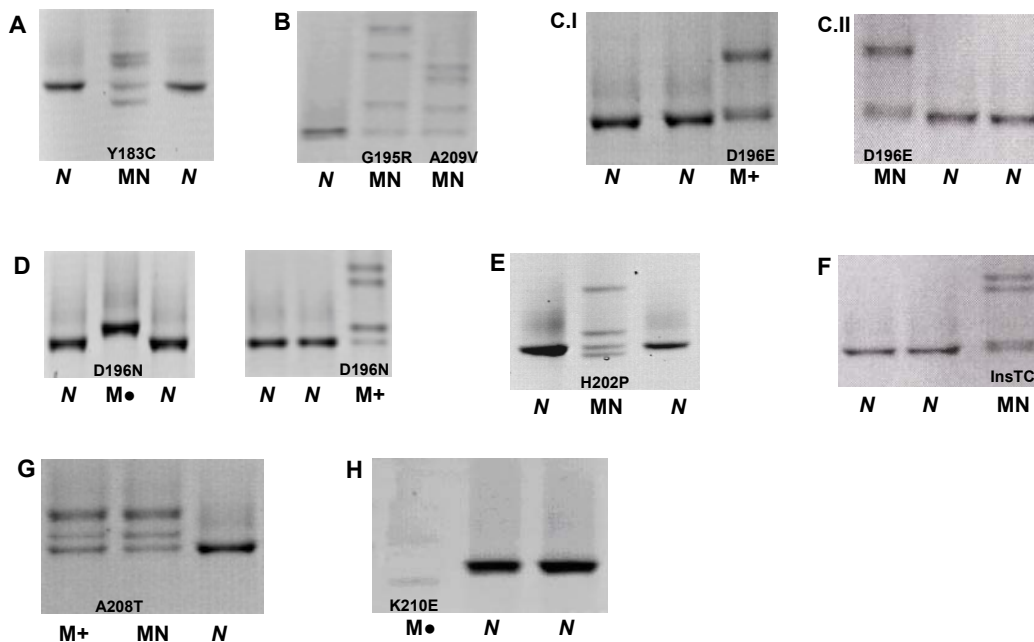
**Bild 3-22 Sequenzanalyse der Mutation Q180H (heterozygot) in Exon 5 des *OTC*-Gens.**

Bei der weiblichen Patientin Nr. 27 wurde in der Sequenzanalyse neben der heterozygoten Mutation Q180H der Polymorphismus IVS4-7a>g homozygot nachgewiesen. Die Mutation Q180H entsteht durch Substitution der Base G durch C an cDNA-Position 540 (heterozygot).

**IVS5+1g>c**

**Bild 3-23 Sequenzanalyse der Mutation IVS5+1g>c (heterozygot) in Intron 5 des *OTC*-Gens.**

Die Mutation IVS5+1 wurde bei der Patientin Nr. 29 heterozygot nachgewiesen und betrifft die erste Base im Intron 5 durch Substitution der Base G durch A. Zusätzlich fand sich der Polymorphismus IVS4-7a>g homozygot.

**Exon 6****Bild 3-24 Ergebnisse der DGGE Analyse Exon 6.**

**A:** Darstellung der Mutation Y183C (*heterozygot*). **B:** Darstellung der Mutation G195R und A209V (*heterozygot*). **C:** Darstellung der Mutation D196E. **C.I** zeigt das Ergebnis eines männlichen Patienten, dessen DNA mit Wildtyp-DNA gemischt wurde (M+). **C.II** zeigt die DGGE-Analyse einer weiblichen Patientin (MN). **D:** Darstellung der Mutation D196N. Im linken Bild hemizygot durch das Auftreten einer einzigen vom Wildtyp abweichenden Homoduplexbande (M●) zu sehen. Während im rechten Bild die DNA des Patienten mit Wildtyp-DNA gemischt wurde (M+). **E:** Darstellung der Mutation H202P (*heterozygot*). **F:** Darstellung der Insertion c.608\_609insTC. **G:** Darstellung der Mutation A208T. **H:** Darstellung der Mutation K210E (*hemizygot*).

Die Mutation Y183C (c.548A>G) konnte in der DGGE-Analyse (Bild 3-24A –MN–) bei der Patientin Nr. 24 durch das Auftreten von zwei Homoduplexbanden und zwei Heteroduplexbanden, entsprechend einem Wildtyp-Allel und einem mutanten Allel, heterozygot nachgewiesen werden. In Bild 3-24B sind die Mutationen G195R (c.583G>A) und A209V (c.626C>T) dargestellt. Man erkennt neben dem Wildtyp (N) anhand der unterschiedlichen Bandenmuster, dass es sich erstens um heterozygote Veränderungen entsprechend einem Wildtyp-Allel und einem mutanten Allel handelt. Zweitens lässt das verschiedene Laufverhalten der Homo- und Heteroduplexbanden im Gel erkennen, dass es sich um zwei unterschiedliche Mutationen handeln muss. In Bild 3-24C ist die Mutation D196E (c.588T>A) in der DGGE-Analyse bei dem männlichen Patienten 43 und der weiblichen Patientin 44 dargestellt. Da die Homoduplexbande dieser Mutation nicht von der Wildtypbande unterscheidbar ist, zeigte sich in der DGGE-Analyse ein auffälliger Befund erst nach Mischung der DNA-Probe mit einem

männlichen Wildtyp. Dadurch entsteht wie in Bild 3-24C.I-M+- gezeigt, ein heterozygot erscheinendes Bandenmuster, welches dem bei der weiblichen Patientin (Bild 3-24C.II-MN-) entspricht.

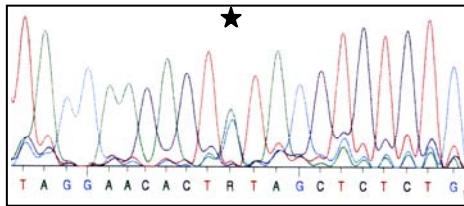
Bei Patient Nr. 6 detektierten wir in der DGGE-Analyse eine vom Wildtyp (N) abweichende Homoduplexbande (M●). In einer weiteren DGGE-Analyse haben wir die DNA des potentiell erkrankten hemizygoten männlichen Patienten mit männlicher Wildtyp-DNA gemischt und erzeugten damit ein heterozygot erscheinendes Bandenmuster (siehe Bild 3-24D rechts-M+-). Man erkennt insgesamt 4 Banden, wovon eine dem Wildtyp entspricht (Wildtyp-Allel), eine weitere Homoduplexbande und zwei Heteroduplexbanden.

Die Mutation H202P (c.605A>C) konnte heterozygot in der DGGE-Analyse durch das Auftreten von zwei Homoduplexbanden und zwei Heteroduplexbanden nachgewiesen werden. In Bild 3-24E erkennt man bei MN eine Homoduplexbande übereinstimmend mit der Wildtypbande, eine weitere Bande unterhalb der Wildtypbande sowie zwei Heteroduplexbanden oberhalb der Wildtypbande.

Bei der weiblichen Patientin Nr. 49 zeigte die DGGE-Analyse vom Wildtyp abweichend zwei Homoduplexbanden mit sehr großen Abstand zwischen zwei Heteroduplexbanden (Bild 3-24F). In der anschließenden Sequenzierung von Exon 6 konnte die Insertion von 2 Basen (TC) an der Position 608\_609 der cDNA des *OTC*-Gens nachgewiesen werden.

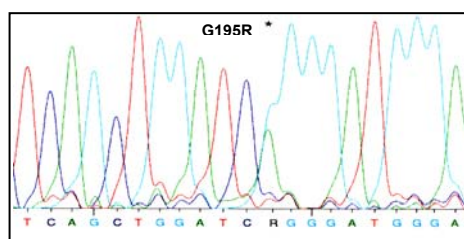
Die Mutation A208T (c.622G>A) haben wir sowohl bei männlichen (hemizygot) als auch bei weiblichen Patienten (heterozygot) nachgewiesen. In Bild 3-24G gezeigt ist ein Ausschnitt der DGGE-Analyse von Exon 6, wo vom Wildtyp (N) abweichende DNA-Veränderungen mit gleichem Bandenmuster auftreten. Es lässt sich im Vergleich mit dem Wildtyp (N) deutlich ein heterozygoter Genotyp (MN) abgrenzen. Durch Mischung einer Wildtyp-DNA-Probe mit der für die Mutation hemizygoten DNA-Probe, erhält man das einem heterozygoten Genotyp entsprechende Bandenmuster (M+); allerdings überwog im dargestellten Fall mengenmäßig die Wildtyp-DNA, weswegen die Mutation-Homoduplexbande schwächer erscheint.

Bei dem männlichen Patienten Nr. 11 zeigte sich eine vom Wildtyp (N) abweichende DNA-Veränderung in Exon 6 (im Bild 3-24H), welche aufgrund der schlechten DNA-Qualität der Probe Nr. 11 nur schwach zu erkennen war.

**Y183C / c.548A>G**

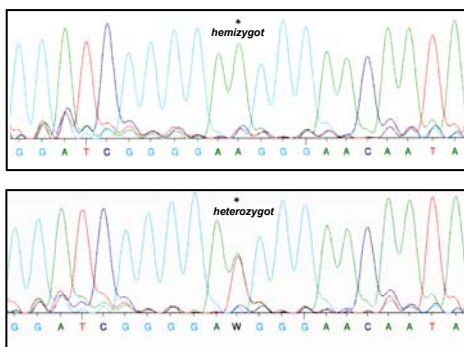
**Bild 3-25 Sequenzanalyse der Mutation Y183C in Exon 6 des *OTC*-Gens (heterozygot).**

Die Mutation Y183C wurde in der Sequenzanalyse bei Pat. Nr. 24 heterozygot nachgewiesen. Die Substitution der Base A durch G an cDNA-Position 548 des *OTC*-Gens betrifft das Codon Nr. 178, welches nun nicht mehr für die Aminosäure Tyrosin (TAT) sondern für Cystein (TGT) kodiert.

**G195R / c.583G>A**

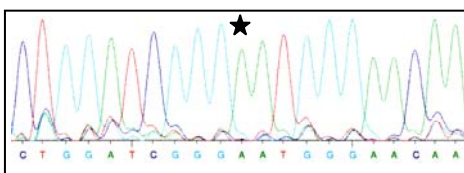
**Bild 3-26 Sequenzanalyse der Mutation G195R in Exon 6 des *OTC*-Gens (heterozygot).**

Bei dieser Mutation handelt es sich um eine CpG-Mutation, bei der die Substitution der Base G durch A im Codon Nr. 195 zu einem Austausch der Aminosäure Glycin (GGG) durch Arginin (AGG) führt. Expressionsstudien zeigten keine nachweisbare *OTC*-Aktivität (Tuchman *et al.* 1994).

**D196E / c.588T>A**

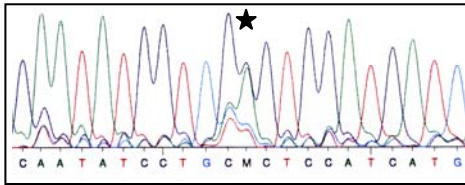
**Bild 3-27 Sequenzanalyse der Mutation D196R in Exon 6 des *OTC*-Gens.**

Diese Mutation wurde bei dem männlichen Patient Nr. 43 hemizygot und der weiblichen Patientin Nr. 44 heterozygot nachgewiesen. In der Sequenzanalyse zeigt sich die Mutation D196E durch eine Substitution der Base T durch A an cDNA-Position 588 des *OTC*-Gens.

**D196N / c.586G>A**

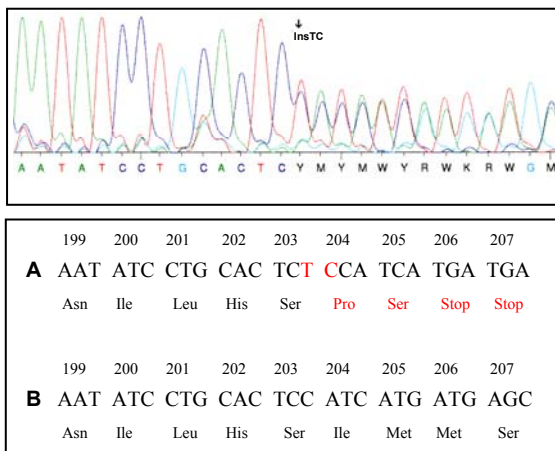
**Bild 3-28 Sequenzanalyse der Mutation D196N in Exon 6 des *OTC*-Gens (hemizygot).**

Bei Patient Nr. 6 haben wir in der Sequenzanalyse von Exon 6 die Mutation D196N identifiziert, durch welche das Codon Nr. 196 nicht mehr für die Aminosäure Aspartat (GAT) sondern für Asparagin (AAT) kodiert.

**H202P / c.605A>C**

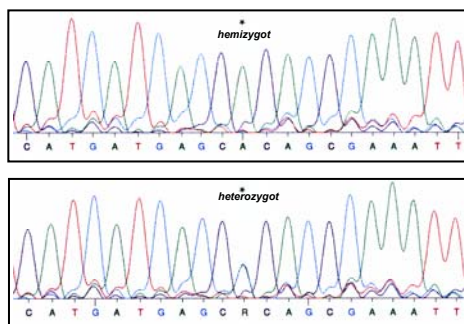
**Bild 3-29 Sequenzanalyse der Mutation H202P in Exon 6 des *OTC*-Gens (heterozygot).**

In der Sequenzanalyse zeigte sich die Mutation durch die Substitution der Base Adenin durch Cytosin an cDNA-Position 605, wodurch Codon Nr. 202 nicht mehr für Histidin (CAC) sondern für Prolin (CCC) kodiert.

**c.608\_609insTC**

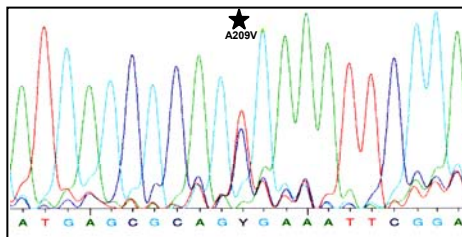
**Bild 3-30 Sequenzanalyse der Insertion c.608\_609insTC in Exon 6 des *OTC*-Gens.**

In der Sequenzierung von Exon 6 der weiblichen Patientin Nr. 49 wurde eine Insertion nachgewiesen. Die Insertion von 2 Basen (TC) an cDNA-Position 608\_609 des *OTC*-Gens führt zu einer Verschiebung des Leserasters (Frameshift) und somit zu einer Veränderung der nachfolgenden Aminosäuren im Genprodukt.

**A208T / c.622G>A**

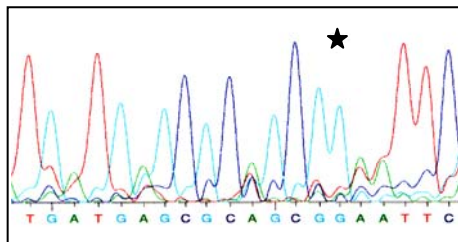
**Bild 3-31 Sequenzanalyse der Mutation A208T in Exon 6 des *OTC*-Gens.**

Die Mutation A208T wird durch Substitution der Base G durch A an cDNA-Position 622 bedingt, wodurch das Codon GCA nicht mehr für die Aminosäure Alanin kodiert, sondern mit dem Codon ACA für Threonin. Die Mutation konnte sowohl hemizygot als auch heterozygot nachgewiesen werden.

**A209V / c.626C>T**

**Bild 3-32 Sequenzanalyse der Mutation A209V in Exon 6 des *OTC*-Gens (heterozygot).**

Durch die Substitution der der Base C durch T an cDNA-Position 626 des *OTC*-Gens entsteht die Mutation A209V.

**K210E / c.628A>G**

**Bild 3-33 Sequenzanalyse der Mutation K210E in Exon 6 des *OTC*-Gens (hemizygot).**

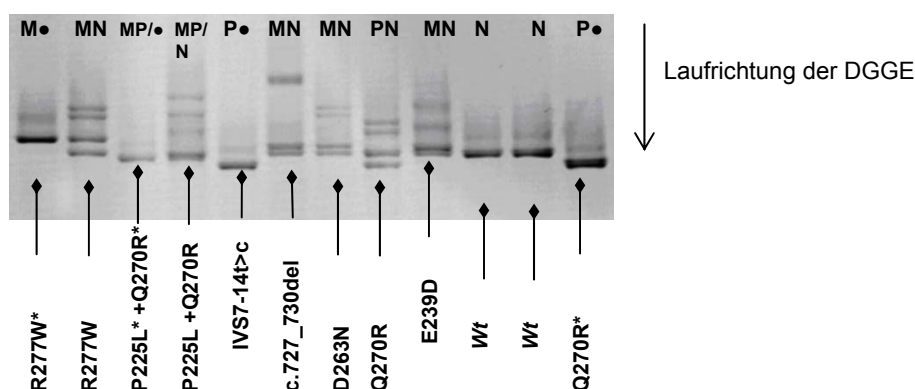
In der Sequenzanalyse zeigte sich die Mutation in einer hemizygoten Substitution der Base Adenin durch Guanin an cDNA-Position 628 des *OTC*-Gens. Das Codon Nr. 210 kodiert somit nicht mehr für die Aminosäure Lysin (AAA) sondern für Glutamat (GAA). Die Sequenzierung konnte trotz schlechter DNA-

Qualität bei dem hemizygoten Patienten Nr. 11 problemlos ausgewertet werden, da bei Hemizygotie die Base A vollständig durch die Base G ersetzt ist.



**Exon 7 / Exon 8**

Für die Amplifikation von Exon 7 und Exon 8 setzten wir aufgrund der Größe von Intron 7 (ca. 80 Basen), ein gemeinsames Primerpaar ein. Dies hat den Vorteil, sowohl in der DGGE als auch in der Sequenzanalyse die Amplifikation eines Exons einzusparen. Allerdings kann man aus der DGGE-Analyse nicht schließen, ob sich die jeweilige DNA-Veränderung in Exon 7 oder 8 befindet.



**Bild 3-34 Übersicht der DGGE-Analyse von Exon 7/ 8 des *OTC*-Gens.**

Die mit dem Stern \* markierten Mutationen sind sowohl hemizygot als auch heterozygot dargestellt.

Homoduplexbanden, zu erkennen an einer oder zwei unteren Banden, können von Heteroduplexbanden, zu erkennen an einer oder zwei oberen Banden, unterschieden werden. Besonders interessant sind die unterschiedlichen Bandenmuster bei den Patienten Nr. 30, 31, 47 und 10. Der Polymorphismus Q270R (c.809A>G) in Exon 8 ist hemizygot (eine Bande in Abwesenheit des Wildtyps) bei Nr. 10 zu sehen und heterozygot (zwei Homoduplexbanden und zwei Heteroduplexbanden) bei Nr. 47. Bei Nr. 30 liegen in Abwesenheit einer Wildtypbande der Polymorphismus und die Mutation auf dem selben Allel, während bei Nr. 31 Polymorphismus und Mutation in cis, d.h. auf einem Allel vorkommen und in trans der Wildtyp vorliegt, d.h. ein Wildtypallel.

Die Varianten P225L, Q270R, R277W sind sowohl hemizygot (siehe Sternmarkierung\*) als heterozygot im Vergleich dargestellt.

Jede der in der DGGE detektierten DNA-Veränderung wurde mit Hilfe der direkten Sequenzanalyse verifiziert. Bei P225L (c.674C>T) und E239D (c.717G>T) handelt es sich um Mutationen in Exon 7.

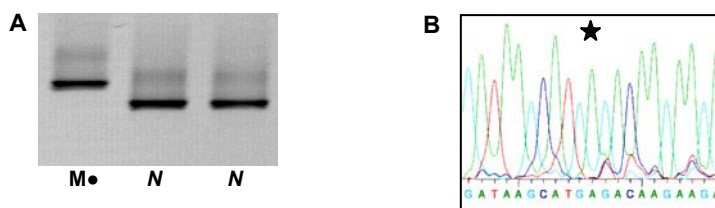
Die Mutationen D263N (c.787G>A), Q270R (c.809A>G), R277W (829C>T) sowie die Deletion c.727\_730del AAGC wurden in Exon 8 detektiert.

Die Basenveränderung IVS7-14t>c in Intron 7 wurde bei dem männlichen Patienten Nr. 32 zusätzlich zur Mutation R129H in Exon 4 detektiert. Da sie relativ weit im Intron liegt, ist eine funktionelle Bedeutung unwahrscheinlich. Bei einem anderen Patienten mit der Mutation R129H lag IVS7-14t>c nicht vor (DGGE-Analyse).

Bei Q270R handelt es sich um einen Polymorphismus mit einer Allelhäufigkeit von 87,5% (Tuchman *et al.* 1992).

#### **G269R / c.805G>A**

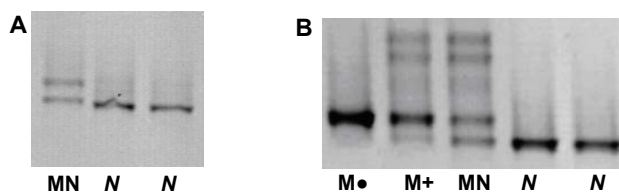
Diese Mutation in Exon 8 wurde hemizygot in der DGGE-Analyse durch das Auftreten einer Homoduplexbande, welche sich durch die Position im Gel deutlich von der Wildtypbande abgrenzen ließ, nachgewiesen.



**Bild 3-35** Darstellung der Mutation G269R (*hemizygot*) in Exon 8 des OTC-Gens.

**A: DGGE-Analyse. B: Sequenzanalyse:** Substitution der Base G durch A an Position 805 der genomischen DNA.

### **Exon 9**



**Bild 3-36** Ergebnisse der DGGE-Analyse Exon 9.

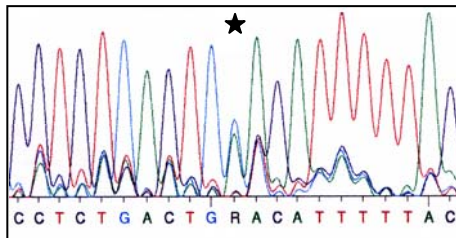
**A: Darstellung der Mutation W298X (MN-heterozygot). B: Darstellung der Mutation W332X hemizygot in M+, heterozygot erscheinend in gemischter Probe M+ sowie heterozygot in MN.**

In der DGGE-Analyse wurde bei Patientin 34 abweichend von der Wildtypbande eine heterozygot erscheinende DNA-Veränderung in Exon 9 (Bild 3-36A-MN) nachgewiesen.



In der DGGE-Analyse in Bild 3-36B lässt sich im Vergleich mit dem Wildtyp (N) deutlich ein hemizygoter Genotyp durch eine Homoduplexbande (M●) von einem heterozygoten Genotyp (MN) abgrenzen. Durch Mischung einer Wildtyp-DNA-Probe mit einer für die Mutation hemizygoten DNA-Probe (M+), erhält man das einem heterozygoten Genotyp entsprechende Bandenmuster.

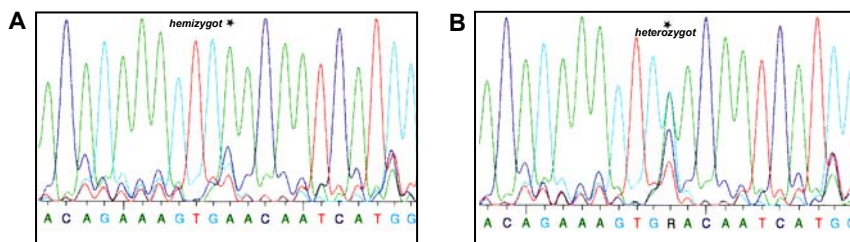
#### W298X / c. 894G>A



**Bild 3-37 Sequenzanalyse der Mutation W298X (heterozygot) in Exon 9 des OTC-Gens.**

Die Substitution der Base G durch A verändert das Codon Nr. 298, welches für die Aminosäure Tryptophan (TGG) kodierte zu einem Stopcodon (TGA). Eine solche Mutation wird auch Nonsense-Mutation genannt.

#### W332X / c.996G>A

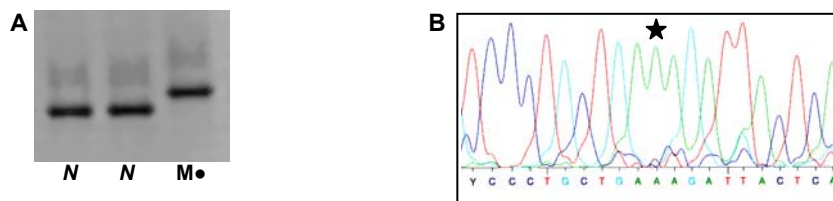


**Bild 3-38 Sequenzanalyse der Mutation W332X in Exon 9 des OTC-Gens.**  
Bild A: Mutation W332X hemizygot. Bild B: Mutation W332X heterozygot.

Die Mutation W332X ist eine Nonsense-Mutation, welche mit einer neonatalen Manifestation des OTC-Mangels vereinbar ist (Matsuura *et al.* 1994). Substitution der Base G durch A an cDNA-Position 996 des OTC-Gens wird das Codon TGG in das Stopcodon TGA umgewandelt.

**Exon 10****T343K / c.1028C>A**

In der DGGE-Analyse wurde bei Probe Nr. 10 abweichend von der Wildtypbande eine hemizygot erscheinende DNA-Veränderung nachgewiesen (eine Homoduplexbande-M●), und in der Sequenzanalyse als Mutation T343K identifiziert. Dabei wird die Base C durch A an cDNA-Position 1028 des *OTC*-Gens in Exon 10 substituiert. Das Codon Nr. 343 kodiert somit nicht mehr für die Aminosäure Threonin (ACA) sondern für Lysin (AAA).



**Bild 3-39** Darstellung der Mutation T343K (hemizygot) in Exon 10 des *OTC*-Gens.

**A:** DGGE-Analyse. **B:** Sequenzanalyse.

## C Darstellung der Analyseergebnisse für die Indexpatienten

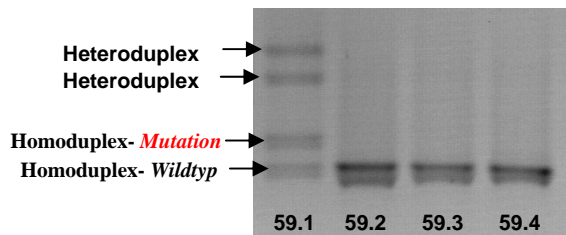
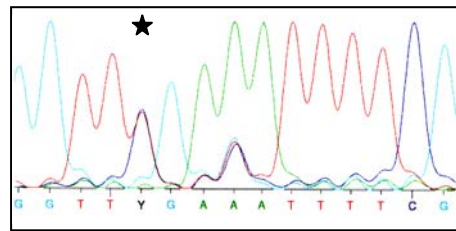
Im Rahmen der molekulargenetischen Untersuchung von 10 Patienten mit Verdacht auf OTC-Mangel sowie deren 15 Familienangehörigen, wurden insgesamt 10 unterschiedliche DNA-Varianten nachgewiesen (siehe Kapitel III-A). Darunter waren eine Variante (-176c>g) in der Promotorregion, eine Nonsense-Mutation (R23X) in Exon 1, eine Insertion in Exon 5 (c.417\_418insTATTG), eine Donorsplicesite-Mutation (E239D) in Exon 7, sowie eine konservative Missense-Mutation in Exon 5 (Austausch durch chem. verwandte AS), eine nichtkonservative Missense-Mutation in Exon 10 (Austausch durch AS unterschiedlicher Strukturklasse bzw. Polarität) sowie fünf häufige Polymorphismen.

Bei den Indexpatienten 54., 55., 56., 57., 58. konnte durch die molekulargenetische Untersuchung keine Mutation nachgewiesen werden.

Im Folgenden werden die Ergebnisse der Untersuchungen bei den Indexpatienten, bei denen Mutationen entdeckt wurden, dargestellt.

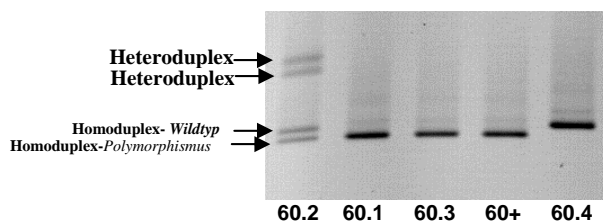
### **Indexpatient 59**

Bild 3-40A zeigt die DGGE-Analyse von Exon 1 des *OTC*-Gens der Familie 59. Die weibliche Indexpatientin 59.1 zeigt verglichen mit der Mutter (59.2), dem Vater (59.3) und der Schwester (59.4), eine Abweichung vom normalen Bandenmuster. Erkennbar ist dies durch das Vorhandensein einer zusätzlichen Homoduplexbande und zwei Heteroduplexbanden neben der *Wildtyp*-Homoduplexbande. Durch direkte Sequenzierung von Exon 1 wurde die Mutation R23X in heterozygoter Form bei Patientin 59.1 nachgewiesen (Bild 3-40B). Die Substitution der Base Cytosin durch Tyrosin an Position 67 der cDNA des *OTC*-Gens verändert das Codon Nr. 23, welches für die Aminosäure Arginin (CGA) kodierte, zu einem Stopcodon (TGA).

**Exon 1- R23X****Bild 3-40A:** Exon 1 der DGGE von Fam.59.**Bild 3-40B:** Auszug der Sequenzanalyse von Exon 1 mit der Mutation R23X als Stern gekennzeichnet.**Indexpatient 60**

Wir analysierten die gesamte kodierende Region des *OTC*-Gens sowie angrenzende Intronabschnitte mittels DGGE beim Indexpatienten 60.1, der Mutter 60.2, beim Fetus 60.3 und beim Vater 60.4. Eine vollständige Sequenzierung inkl. der 5'-nicht-translierten Region führten wir beim Indexpatienten 60.1 durch sowie beim Fetus Sequenzierung der 5'-nicht-translierten Region und Exon 2, 4, 5 und 10. Bei der Mutter erfolgte ebenfalls die Sequenzierung der 5'-nicht-translierten Region und von Exon 2 und 4.

In der DGGE-Analyse von Exon 1 bis 10 des *OTC*-Gens der Familie 60 fand sich in Exon 2 eine Abweichung vom Bandenmuster eines Wildtyps (Bild 3-41). Erkennbar sind zwei Homoduplexbanden und zwei Heteroduplexbanden bei der Mutter (60.2) sowie unterschiedliche Homoduplexbanden bei dem Indexpatienten (60.1) und dem Fetus (60.3) einerseits sowie beim Vater (60.4) andererseits.

**Bild 3-41 DGGE-Analyseausschnitt von Exon 2 des *OTC*-Gens.** Die Reihenfolge der Proben von links nach rechts ist wie folgt: 60.2-Mutter, 60.1-Männl.Patient, 60.3-Fetus, 60+-Männl.Patient und Fetus gemischt, 60.4-Vater. Eine Mischung der Probe 60.1 und 60.3 erfolgte unter der Vorstellung, eine Allelidentität der männlichen Geschwister im kodierenden Bereich des *OTC*-Gens zu prüfen.

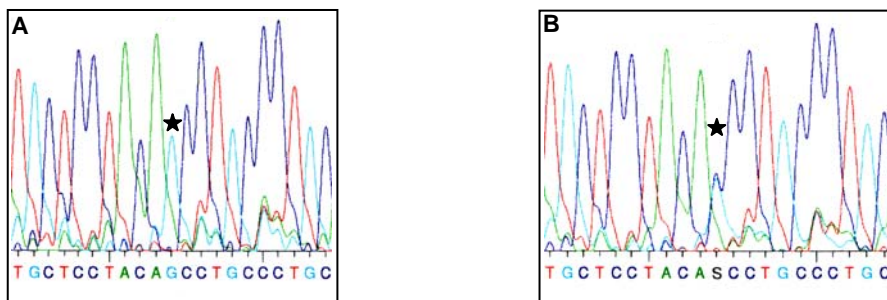
Der Vergleich mit bereits bekannten Bandenmustern (siehe Bild 3-7-Kapitel B) legte die Vermutung nahe, dass es sich um den bekannten Polymorphismus K46R heterozygot bei der Mutter und hemizygot beim Indexpatienten und dem Fetus handelt. In der Sequenzanalyse wurde dies bestätigt. Die DGGE Analyse der übrigen Exons zeigte keine vom Wildtyp abweichenden Bandenmuster. Wir schlossen nachfolgend eine direkte Sequenzanalyse der gesamten kodierenden Region des *OTC*-Gens, inklusiv angrenzender Intronabschnitte und der 5'-nicht-translierten Region, zunächst beim Indexpatienten an. Dabei wurde hemizygot neben dem Polymorphismus K46R in Exon 2, in der 5'-nicht-translierten Region die Sequenzvariante c.-176c>g, in Exon 4 der Polymorphismus F101L, im Intron 4 der Polymorphismus IVS4-7a>g und Intron 9 der Polymorphismus IVS9-12g>t nachgewiesen. Die fetale DNA ist in den durchgeführten Untersuchungen identisch mit der DNA des Indexpatienten 60.1. Insbesondere finden sich ebenfalls die Sequenzvarianten c.-176c>g, K46R, F101L, IVS4-7a>g und IVS9-12g>t. Bei der Mutter zeigte die Sequenzanalyse der 5'-nicht-translierten Region, von Exon 2 und Exon 4 die Variante c.-176c>g heterozygot, den Polymorphismus K46R heterozygot, IVS3-8a>t heterozygot, F101L homozygot. Darüber hinaus fanden wir mehrere heterozygote Sequenzvarianten in der 5'-nicht-translierten Region. Einen Hinweis auf eine potentiell krankheitsauslösende Mutation in der Familie fanden wir nicht.

**Tabelle III-2 Zusammenfassung der Analyseergebnisse vom Indexpatienten 60.1, der Mutter 60.2 und des Fetus 60.3.**

	<u><b>Mutation:</b></u>	<u>assozierte Polymorphismen und andere Varianten:</u>
<b>60.1-Indexpatient</b>	nicht nachweisbar	c.-176c>g, K46R, F101L, IVS4-7a>g, IVS9-12g>t
<b>60.3-Fetus</b>	nicht nachweisbar	c.-176c>g, K46R, F101L, IVS4-7a>g, IVS9-12g>t
<b>60.2-Mutter</b>	nicht nachweisbar	c.-176c>g, K46R, F101L, , IVS3-8a>t

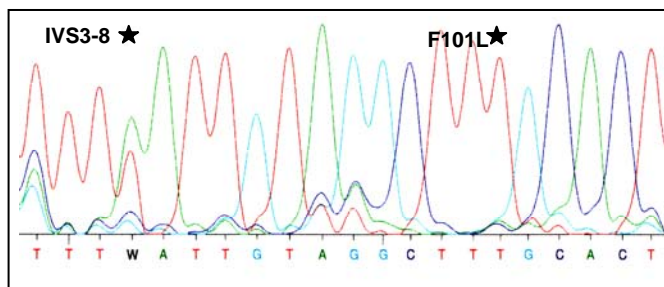
## Sequenzanalyse

c.-176c>g



**Bild 3-42 Darstellung der Sequenzvariante c.-176c>g in der 5'-nichttranslierten Region:** Hemizygot in A beim Indexpatienten 60.1. Heterozygot in B bei der Mutter 60.2.

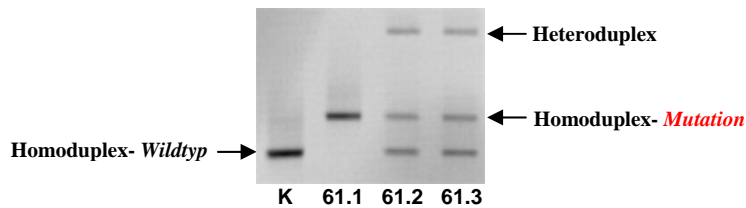
## IVS-8a>T und F101L



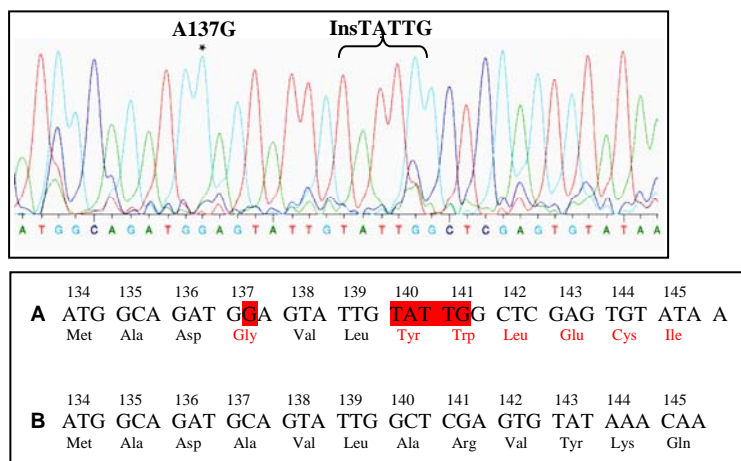
**Bild 3-43 Darstellung der nachgewiesenen Polymorphismen IVS3-8a>t und F101L in Exon 4 bei der Mutter.**

## Indexpatient 61

In der DGGE-Analyse fand sich in Exon 5 eine Abweichung vom normalen Bandenmuster beim Indexpatienten 61.1 (männlich), der Mutter des Patienten 61.2 und der Schwester des Patienten 61.3. Im Vergleich zur Wildtyp-Kontrolle K mit einer Homoduplexbande, erkennt man bei dem männlichen Patienten eine höher gelegene einzelne Homoduplexbande. Bei der Mutter und Schwester des Patienten kommt zu dieser Homoduplexbande noch eine weitere Heteroduplexbande. Beispielhaft illustriert dies das Erscheinungsbild einer hemizygot oder heterozygot vorliegenden Mutation.

**Exon 5- A137G; A140fsins****Bild 3-44 DGGE-Analyseausschnitt von Exon 5 des *OTC*-Gens.**

Die direkte Sequenzanalyse von Exon 5 zeigte die Substitution der Base Cytosin durch Guanin an der Position 410 der cDNA des *OTC*-Gens sowie eine Duplikation von 5 Basen an der Position 417 der cDNA des *OTC*-Gens. Weil die Insertion nicht durch 3 teilbar ist, kommt es zu einer Verschiebung des Leserasters (Frameshift) und zu einer Veränderung der nachfolgenden Aminosäuren im Genprodukt (Siehe Bild 3-45).

**Bild 3-45 Sequenzanalyseausschnitt im Bereich der Mutation A137G sowie der Insertion von 5 Basen TATTG in Exon 5 des *OTC*-Gens. A: Darstellung des mutierten Sequenzausschnittes.**

**B: Kontrollsequenz.** In der ersten Zeile ist jeweils die Nummer des Codons, in der zweiten die Sequenz und in der dritten die resultierende Aminosäure angegeben. Der rote Balken kennzeichnet die Mutation und Insertion. Die veränderten Aminosäuren sind in roter Schriftfarbe zu sehen.

**Indexpatient 62**

Die DGGE-Analyse von Exon 1-10 des *OTC*-Gens der ungarischen Familie 62, zeigte im Exon 7/8 bei der Indexpatientin 62.1 eine Abweichung vom normalen Bandenmuster. Die Analyse der Eltern war unauffällig, speziell war bei keinem der Eltern die Mutation/ Homoduplexbande nachweisbar.

In der direkten Sequenzanalyse wurde bei der Patientin in Exon 7 die Basensubstitution Guanin zu Tyrosin an Position 717 der cDNA des *OTC*-Gens identifiziert. Diese Basensubstitution betrifft die letzte Base in Exon 7; sie liegt bei der Patientin heterozygot vor.

#### Exon 7- E239D

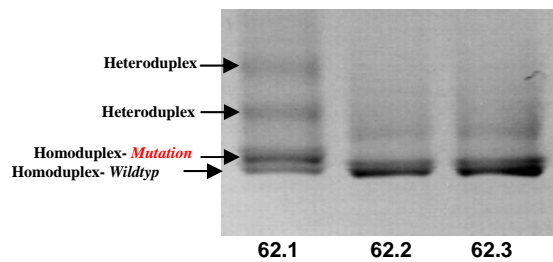


Bild 3-46 DGGE-Analyseausschnitt von Exon 7/ 8 des *OTC*-Gens.

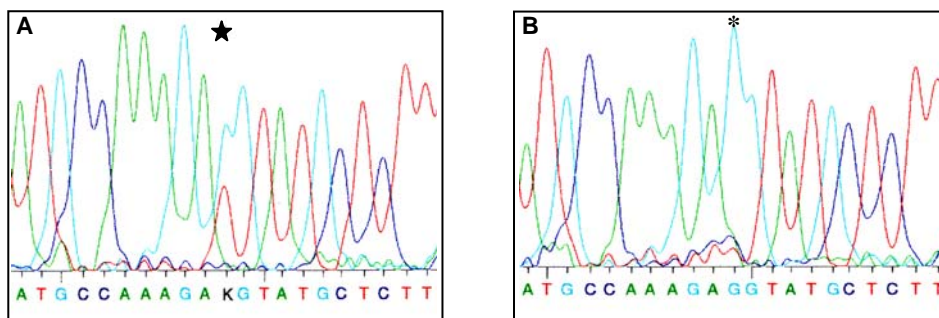
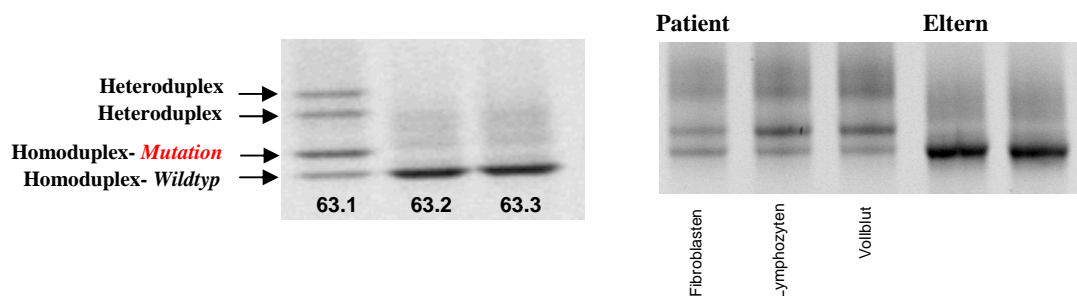


Bild 3-47 Sequenzanalyseausschnitt.\*Substitution der Base G durch T im Exon 7 des *OTC*-Gens: Heterozygot bei der Indexpatientin in Bild A. Wildtyp bei der Mutter und beim Vater als Kontrollsequenz in Bild B.



**Indexpatient 63**

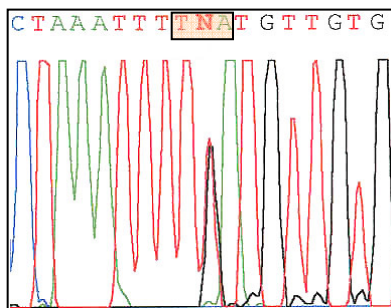
Bei dem männlichen Patienten 63.1 sowie bei der Mutter 63.2 und dem Vater 63.3 wurde eine DGGE-Analyse der DNA aus Vollblut durchgeführt. Später wurde die DGGE Analyse beim Indexpatienten in DNA aus Fibroblasten und isolierten Lymphozyten wiederholt. In Exon 10 des *OTC*-Gens zeigte sich beim Indexpatienten eine anscheinend heterozygot auftretende Abweichung im Bandenmuster sowohl im Vollblut als auch in Fibroblasten und Lymphozyten. Wie in Bild 3-48 dargestellt, ist bei dem *männlichen* Patienten 63.1 von der *Wildtyp*-Homoduplexbande deutlich eine zusätzliche Homoduplexbande und zwei Heteroduplexbanden abgrenzbar. Die DGGE-Analyse der Eltern war durch das Auftreten eines dem Wildtyp entsprechenden Homoduplexes unauffällig.



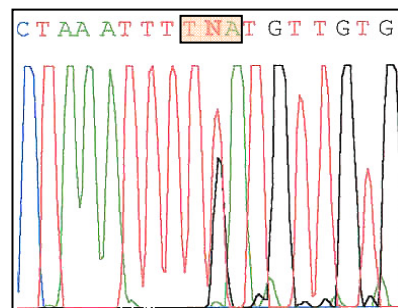
**Bild 3-48 DGGE-Analyseauschnitt von Exon 10 des *OTC*-Gens.** Das Auftreten von zwei verschiedenen Allelen in unterschiedlichen Zellpopulationen bei einem männlichen Patienten mit unauffälligem Karyotyp impliziert das Vorliegen eines somatischen Mosaikes bei dem Indexpatienten.

In der sich anschließenden Sequenzanalyse von Exon 10, konnte bei dem Patienten die bisher noch nicht beschriebene Stop-Codon Mutation X355L scheinbar *heterozygot* in der DNA aus Vollblut, Fibroblasten und Lymphozyten identifiziert werden. In Bild 3-49 erkennt man beim Indexpatienten an Position 1064 der genomischen DNA eine Überlagerung von 2 Peaks anstelle eines Peaks für die Base G. Der für die Base G stehende Peak erscheint im Vergleich um ca. knapp die Hälfte der Höhe reduziert. In der Sequenzanalyse aus Fibroblasten liegen beide Peaks in etwa gleicher Höhe, während man in der Analyse aus Vollblut einen die Base G überragenden Peak erkennt. In der Sequenzanalyse von Exon 10 der Eltern fand sich an entsprechender Position der Wildtyp. Die Mutation X355L wird durch eine Substitution der Base Guanin durch Tyrosin an cDNA-Position 1064 des *OTC*-Gens erzeugt. Das Codon Nr. 355 kodiert somit nicht mehr für STOP (TGA) sondern für Leucin (TTA). Hierdurch werden 13 zusätzliche Aminosäuren bis zum nächsten Stopcodon TAA in das 3'-Ende des Translationsproduktes eingefügt.

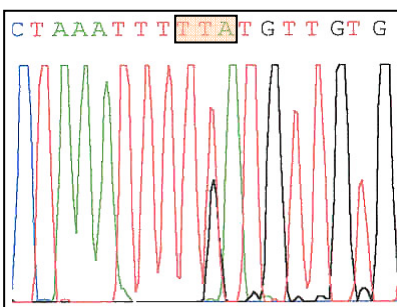
**aus Fibroblasten**



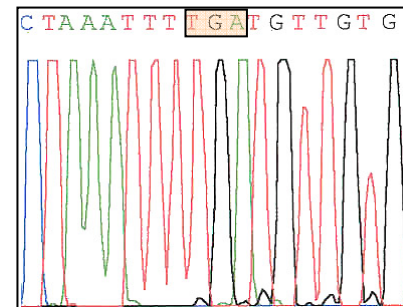
**aus Lymphozyten**



**aus Vollblut**



**Sequenzanalyse der Eltern- Exon 10**



**Bild 3-49 Sequenzanalyseausschnitt von Exon 10 des *OTC*-Gens beim Indexpatienten im Vergleich aus Fibroblasten, Lymphozyten und Vollblut.** Substitution der Base Guanin durch Tyrosin an Position 1064 der cDNA des *OTC*-Gens. Die Sequenzanalyse der Eltern zeigte an entsprechender Position einen Wildtyp.

## KAPITEL IV : DISKUSSION

### A Allgemeine Betrachtung der DGGE Analytik

Der erste Abschnitt der vorliegenden Dissertation beschäftigte sich mit der Validierung der DGGE (Denaturierungs-Gradienten-Gel-Elektrophorese) als Methode zum Screening von Mutationen im *OTC*-Gen. Für den Einsatz einer Screeningmethode in der klinischen Diagnostik werden sowohl eine hohe Sensitivität als auch eine hohe Spezifität gefordert. Begründet liegt dies in dem Ziel, mit dieser Methode möglichst alle Mutationen erfassen zu können (hohe Sensitivität) und weitere diagnostische Schritte auf ein Minimum einzugrenzen (hohe Spezifität). In der klinischen Routine sollten darüber hinaus zum Mutationsnachweis zwei voneinander unabhängige Methoden eingesetzt werden. Praktisch haben wir dies durch den Einsatz der DGGE und die anschließende Sequenzierung realisiert.

Bei der DGGE-Analyse von insgesamt 53 DNA-Proben, konnte bei 48 von 48 Proben die gesuchte DNA-Veränderung nachgewiesen werden. Bei 5 von 5 Negativproben wurde das Fehlen einer pathologischen Mutation bestätigt. Aus diesen Daten ergibt sich für diese Untersuchung eine Sensitivität von 100 Prozent, wobei jedoch nicht ausgeschlossen werden kann, dass einzelne Mutationen im Sonderfall von der Methodik nicht erfasst wurden.

Ob eine diagnostische Methode in der Routine eingesetzt wird oder nicht, ist nicht nur von einer hohen Sensitivität und Spezifität abhängig. Es müssen sowohl Faktoren, welche von der Erkrankung selbst bestimmt werden, als auch Faktoren, die Einfluss auf die Praktikabilität einer Methode nehmen, berücksichtigt werden. Nicht an letzter Stelle stehen natürlich auch Aufwand bzw. Kosten für eine molekulare Diagnostik in der klinischen Routine.

Die DGGE ist eine effiziente und reproduzierbare Screeningmethode in der Mutationsanalyse.

Hervorzuheben, insbesondere im Vergleich mit anderen in der Routine eingesetzten Screeningverfahren, ist die sehr hohe Sensitivität bei zugleich überschaubarem Kostenaufwand. In einer aktuellen Veröffentlichung wird beispielsweise die Anwendung der DGGE zur Detektion von Mutationen in den beiden Brust-Krebs Genen *BRCA1* und *BRCA2* als zuverlässiges, reproduzierbares und hochsensitives Verfahren herausgestellt (Hout AH *et al.* 2006). Bei Anwendung der SSCP-Analyse liegt die Sensitivität mit etwa 80% deutlich niedriger, wenngleich es sich bei dieser Methode ebenfalls um eine kosteneffiziente Methode handelt (Cotton 2000). Die direkte Sequenzanalyse ist zwar weiterhin der Goldstandard für die Mutationsdetektion, aber für den OTC-Mangel mit einem im Verhältnis zur DGGE-Analyse eher ungünstigen Kosten-Nutzen Aufwand.

### **Hemizygotie und Heterozygotie**

Durch den X-chromosomalen Vererbungsmodus sowie durch den hohen Anteil an Neumutationen ergeben sich besondere Ansprüche an die DGGE als Screeningverfahren zur Mutationsanalyse. Männliche Individuen sind hemizygot Mutationsträger für den OTC-Mangel, entsprechend einer Homoduplexbande in der DGGE, welche sich jedoch nicht immer von der Wildtypbande unterscheiden muß. Weibliche Individuen sind durch das Vorhandensein von zwei unterschiedlichen Allelen in der Regel heterozygot, entsprechend dem Auftreten von Homo- und Heteroduplexbanden in der DGGE. Daraus ergibt sich, dass beim OTC-Mangel keine Homozygotie für krankheitsverursachende Mutationen beobachtet wird. Bei männlichen Patienten kann durch die Zugabe von Wildtyp-DNA mit anschließender Denaturierung und Abkühlung die Bildung von Heteroduplexen bewirkt werden, da sich Einzelstränge mit einer Mutation an die komplementären Einzelstränge des Wildtyp-Allels anlagern können. In der DGGE lässt sich dann ein Bandenmuster mit Homo- und Heteroduplexen erkennen. In Kapitel III-B Bild 3-36B ist das Bandenmuster für die Mutation W332X für einen männlichen Patienten hemizygot sowie nach Mischung mit Wildtyp-DNA heterozygot erscheinend und für eine weibliche Patientin heterozygot beispielhaft gezeigt. Diese Kenntnisse waren eine große Hilfe bei der Interpretation des DGGE-Ergebnisses von Indexpatient Nr. 63, bei welchem wir schon nach der DGGE den Verdacht auf ein genomisches Mosaik stellten.

### Mutationsspektrum

Beim OTC-Mangel wird keine Prävalenz bestimmter Mutationen, wie zum Beispiel bei der Cystischen Fibrose, beobachtet. Daraus ergibt sich, dass sich die Mutationsanalyse nicht auf die Suche nach bestimmten, häufig auftretenden Mutationen beschränken darf und möglichst umfassend erfolgen sollte.

Unter Berücksichtigung des Mutationsspektrums beim OTC-Mangel, nämlich dass ca. 84% Punktmutationen ausmachen, kleine Deletionen sowie Insertionen mit ca. 12% und große Deletionen mit 4% einen im Verhältnis zwar geringen aber bedeutenden Anteil einnehmen (Yamaguchi *et al.* 2006), stellte sich die DGGE zur Detektion von verschiedenen Mutationstypen als ein besonders geeignetes Verfahren beim OTC-Mangel heraus. Denn insbesondere das Auffinden von Deletionen gestaltet sich mit vergleichbaren Screeningverfahren und sogar der Sequenzanalyse in der Regel schwierig.

Wie im Kapitel III-B des Ergebnisteils dargestellt, konnten mit der DGGE 29 heterozygot und 16 hemizygot vorliegende Mutationen im *OTC*-Gen detektiert werden. Am häufigsten handelte es sich um Substitutionen einzelner Basen. Daneben wurden auch eine Deletion und drei Insertionen nachgewiesen, welche sich durch einen großen Abstand zwischen Homo –und Heteroduplexbanden von Punktmutationen unterscheiden ließen (siehe Bild 3-13; 3-24F; 3-34: c.727\_730del und 3-44).

### Transitionen und Transversionen

Unter den hemizygot vorliegenden Mutationen waren 14 Transitionen (d.h. ein Purinaustausch von  $G \leftrightarrow A$  oder ein Pyrimidinaustausch von  $C \leftrightarrow T$ ) und 2 Transversionen  $T > A$  und  $C > A$  (d.h. Austausch eines Pyrimidins durch ein Purin oder umgekehrt). Wie zu erwarten, lag bei den Transitionen von  $G > A$  und  $C > T$  die mutante Homoduplexbande immer oberhalb der Wildtypbande, während bei den Transitionen von  $A > G$  oder  $T > C$  die Bande unterhalb der Wildtypbande arretierte. Dieses Verhalten ist durch das unterschiedliche Schmelzverhalten der Fragmente zu erklären. Aufgrund der höheren Stabilität von G-C-Hybridisierungen bedingen Substitutionen von A nach G bzw. T nach C eine erhöhte Schmelztemperatur des Fragmentes, so dass die mutante Homoduplexbande im Bereich höherer Konzentration von denaturierenden Agens stehen bleibt als die Wildtyp-Homoduplexbande mit niedrigerer Schmelztemperatur.

Auch bei der Substitution von A nach C lag die mutante Homoduplexbande deutlich unterhalb der Wildtyp-Homoduplexbande, während bei der Substitution von C nach A die mutante Homoduplexbande deutlich oberhalb der Wildtyp-Homoduplexbande arretierte. Bei den Substitutionen von G nach C sowie T nach A und umgekehrt waren dagegen eher geringe Höhenunterschiede zwischen der mutanten und der Wildtyp-Homoduplexbande festzustellen. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass Transversionen von G nach C sowie T nach A und umgekehrt in hemizygoter Form dem Nachweis mittels DGGE entgehen könnten, da sich durch das ähnliche Schmelzverhalten der jeweiligen Fragmente die mutante Homoduplexbande ggf. nicht oder schwer von einer Wildtyp-Homoduplexbande unterscheiden lässt. Diese Schlussfolgerung ist konform mit dem DGGE Ergebnis der Mutation D196E (Transversion von T>A) in Exon 6 bei einem hemizygoten Patienten (siehe Bild 3-24C in Kapitel III-B) sowie der hemizygot nachgewiesenen Mutation T343K (Transversion C>A) in Exon 10 (siehe Bild 3-39A in Kapitel III-B).

Die Mutationen D196E, A208T, P225L, R277W, W332X wurden sowohl in heterozygoter Form als auch in hemizygoter Form nachgewiesen. Die Auswertung des Vergleiches der Höhe von mutanter Homoduplexbande im Vergleich zur Wildtyp-Homoduplexbande ergab für die heterozygot vorliegenden Mutationen, dass sich die mutante Homoduplexbande mit Ausnahme einer Mutation (Q180H) immer von der Wildtyp-Homoduplexbande abgrenzen ließ. Bis auf die Mutation Q180H hätten alle von uns untersuchten heterozygot vorliegenden Mutationen auch in hemizygoter Form nachgewiesen werden können.

Bei der Mutation Q180H liegt beispielhaft eine Transversion von G>C vor. In der DGGE Analyse (siehe Bild 3-17D, Kapitel III-B) sind neben einer in Höhe der Wildtypbande arretierten Homoduplexbande zwei Heteroduplexbanden erkennbar, was für das Vorhandensein von 2 unterschiedlichen Allelen spricht, und eine Heterozygotie erkennen lässt. Der Nachweis in hemizygoter Form wäre durch fehlenden oder minimalen Höhenunterschied im Vergleich zur Wildtypbande schwierig bzw. nicht möglich. Schlussfolgernd können wir feststellen, dass Mutationen durch eine Transition ausnahmslos sowohl in hemi - als auch heterozygoter Form nachweisbar sind.

Mutationen durch Transversionen können dagegen unter Umständen bei hemizygoten Patienten dem Nachweis mittels DGGE entgehen.

Bei männlichen Patienten mit fehlendem Mutationsnachweis nach der DGGE oder fraglichen Analyseergebnis, sollte zur Steigerung der Sensitivität die Mischung der Probe mit Wildtyp-DNA erfolgen, da dann der Mutationsnachweis über die Bildung von Heteroduplexen erfolgen kann.

### **Interpretation des Bandenmusters**

Eine Veränderung der DNA Sequenz kann unterschiedlichen Einfluss auf die Schmelzeigenschaften des DNA-Fragmentes ausüben. Bedingt durch das Muster von Homo- und Heteroduplexbanden entsteht im Gel eine Art „Fingerabdruck“ der Mutation. Mit zunehmender Erfahrung ist es möglich, anhand des heterozygoten Bandenmusters einer genetischen Veränderung im DGGE, unterschiedliche Mutationen und Polymorphismen voneinander abzugrenzen (siehe Kapitel III, Teil B z.B. Exon 7/8). In der Regel erscheinen die jeweiligen Mutationen im DGGE reproduzierbar. Abweichungen bei unterschiedlichen Analyseläufen sind beispielsweise in der Lauflänge zu beobachten, was sich dann in einem gestreckt erscheinenden Bandenmuster zeigt. Als Beispiel ist der Vergleich des Bandenmusters von Polymorphismus K46R in Kapitel III-B, Exon 2 sowie in Kapitel III-C bei Indexpatient Nr. 60 aufzuführen.

Andererseits können verschiedene Sequenzveränderungen im Bandenmuster innerhalb eines Exons ähnlich bzw. gleich erscheinen, so dass eine sichere Unterscheidung von verschiedenen Mutationen oder Polymorphismen anhand des Bandenmusters nicht möglich ist.

In der DGGE könnte man ggf. durch Mischen der jeweiligen Probe mit einer Kontrolle mit bekannter Mutation eine Unterscheidung erreichen. Die Denaturierung der gemischten PCR-Produkte und anschließende langsame Abkühlung führt zur Ausbildung von zusätzlichen Heteroduplexbanden, wenn die beiden mutanten Fragmente nicht identisch sind. Wenn die üblichen Homo- und Heteroduplexbanden ausgebildet werden, handelt es sich um die gleiche Mutation in beiden Proben. Darüber hinaus kann natürlich mit Hilfe der Sequenzierung die zugrunde liegende DNA-Veränderung genauer charakterisiert werden.

Lässt sich in der DGGE nur eine, aber im Vergleich zum Wildtyp abweichende Homoduplexbande nachweisen, kann anhand dieser einzelnen Homoduplexbande in der Regel keine Aussage getroffen werden, um welche Mutation es sich handelt.

Im direkten Vergleich mit dem Bandenmuster der gleichen Mutation von heterozygoten Individuen, ist eine Zuordnung aufgrund der gleichen Höhe der mutanten Homoduplexbande möglich (siehe Kapitel III-B, Bild 3-7A; 3-24D; 3-36B).

### **DGGE in der Routinediagnostik**

Mit Hilfe der DGGE als initiale Screeningmethode lässt sich in der Regel nicht nur die Lokalisation einer Mutation bestimmen, sondern auch eine Vermutung bezüglich der Relevanz der jeweiligen Veränderung treffen. Die Möglichkeit, auch bestimmte Polymorphismen von anderen Mutationen zu unterscheiden, lässt in der molekulardiagnostischen Routine eine gezieltere Sequenzierung der Exons zu. Die Methode gewinnt somit an Aussagekraft, was ein weiteres Kriterium zur Bewertung der Güte eines Tests darstellt. In unserem Fall waren mittels DGGE der Polymorphismus K46R in Exon 2 sowie Q270R in Exon 8 sowohl hemizygot als heterozygot nachweisbar, was sich durch das reproduzierbare Bandenmuster als besonders nützlich zur Differenzierung von anderen Mutationen erwies. Die intronischen Polymorphismen IVS3-8a>g, F101L, IVS4-7a>g und IVS9-12g>t werden bei der gewählten DGGE-Methodik nicht erfasst, sondern wurden in der Sequenzanalyse identifiziert.

Die Nachteile der DGGE sind am ehesten im experimentellen Aufwand (wie z.B. Herstellen der Gellösungen und die manuelle Herstellung der Gradientengele) sowie in der Notwendigkeit spezieller Primer zu sehen. Dem Primerdesign mit einer thermostabilen GC-Klammer kommt eine besonders große Bedeutung zu. Im Gen vorhandene GC-reiche Sequenzen können dazu führen, dass sich der Doppelstrang frühzeitig in die beiden Einzelstränge löst, und sich keine scharfen Banden ausbilden. Mit Hilfe des Computerprogramms OLIGO Primer Analysis Software (MedProbe, Oslo/Norwegen) haben wir die Schmelzeigenschaften der Fragmente mit GC-Klammer an die Primer für Strang oder Gegenstrang simuliert und danach die Primerauswahl getroffen. Unterschiedliche Schmelzdomänen im PCR-Produkt verhindern eine gleichmäßige Denaturierung des Fragmentes, wodurch ein unscharfes Bandenmuster resultiert. Dies kann auch dazu führen, dass manche Mutationen nicht dargestellt werden können.



Wir haben in dieser Untersuchung gezeigt, dass uns in allen Fällen der Nachweis der entsprechenden DNA-Veränderung gelungen ist. Dabei haben wir bei männlichen und weiblichen Patienten neben einfachen Basensubstitutionen, auch Insertionen und Deletionen detektiert. Daraus lässt sich ableiten, dass sich die detektierbaren krankheitsverursachenden Mutationen mittels DGGE zu einem sehr hohen Prozentsatz, wenn nicht vollständig, nachweisen können.

Konnte bei einem Patienten bzw. einer Patientin die krankheitsverursachende Mutation nachgewiesen werden, ist bei Familienangehörigen (siehe z.B. Indexpatient Nr.61 im Vergleich mit Mutter und Schwester im Kapitel III-C) die entsprechende genetische Veränderung schon anhand des spezifischen Bandenmusters in der DGGE erkennbar. Eine Sequenzierung ist dann nicht unbedingt notwendig.

### **Praktisches Vorgehen**

Für die Auswertung einer DGGE-Analyse beim OTC-Mangel ergibt sich folgende Leitlinie:

1. *Allgemein:*

Zuordnung der Banden zu den jeweiligen Exons.

Entsprechen die Ergebnisse der mitgelaufenen Kontrolle den bekannten Befunden? Sind von jedem Patienten alle Exons auswertbar?

2. *Exonspezifische Auswertung:*

- Vergleich der Bandenmuster der verschiedenen Patienten für jedes Exon einzeln.

- Bei welchen Patienten sind Abweichungen von der Wildtypbande erkennbar?

- Falls ja, liegt ein heterozygotes oder hemizygoten Bandenmuster vor?

→ Hemizygotie: eine Homoduplexbande. Heterozygotie bis zu 4 verschiedene Banden.

- Beurteilung der jeweiligen Homo- und Heteroduplexe:

→ Hinweise für Deletion oder Insertion: auffallend großer Abstand der Heteroduplexe von den Homoduplexen.

- Ist das Ergebnis mit dem Geschlecht des Patienten konform?

3. *Patientenspezifische Auswertung:*
  - Auflistung der vom Wildtyp abweichenden Veränderungen für Exon 1 bis Exon 10.
  - Falls vorhanden, Vergleich mit Familienangehörigen.
  - Ergibt sich bereits ein Verdacht auf eine potentiell krankheitsauslösende Mutation bzw. einen Polymorphismus?
  - Ev. Vergleich mit bekannten DGGE-Bildern.
4. Entscheidung, welche Proben und welche Exons sequenziert werden sollen.
5. Nach der Sequenzierung ist es für zukünftige DGGE-Analysen sinnvoll, das Ergebnis der Sequenzanalyse mit dem Ergebnis der DGGE-Analyse abzugleichen. Zu empfehlen ist auch ein digitaler Bildspeicher, in dem man für jedes Exon die entsprechenden Mutationen / Polymorphismen ablegt, um auf Vergleiche zurückgreifen zu können.
6. Bei fehlendem Mutationsnachweis bei einem männlichen Patienten mit dringendem Verdacht auf OTC-Mangel oder bei einem fraglichen Befund, sollte die Probe des jeweiligen Indexpatienten mit Wildtyp-DNA gemischt werden und eine Wiederholung der DGGE-Analyse erfolgen. Unter Umständen spart man damit die komplette Sequenzanalyse.

Kann bei einem Patienten mit einer für einen OTC-Mangel sprechenden klinischen Symptomatik, welche zusätzlich durch biochemische Befunde gestützt wird sowie einer unter Umständen auffälligen Familienanamnese keine Mutation nachgewiesen werden, darf daraus keinesfalls die Schlussfolgerung gezogen werden, dass das Vorliegen eines OTC-Mangels ausgeschlossen ist. In solch einem Fall ist die Bestimmung der Enzymaktivität als invasive Methode zum Nachweis eines OTC-Mangels empfehlenswert. Auch bei heterozygoten Frauen ist in aller Regel eine deutliche, jedoch variable Verminderung der Enzymaktivität nachweisbar, obwohl falsch-negative Messungen aufgrund des X-chromosomalen Inaktivierungsmosaiks nicht vollständig auszuschließen sind. Gegebenenfalls ist die Entnahme mehrerer Biopsien sinnvoll, und eine niedrig-normale Enzymaktivität sollte kritisch beurteilt werden.

Zu beachten ist ebenfalls, dass die Aussagekraft einer Enzymaktivitätsbestimmung gemindert ist, wenn die Gewebeproben vom nicht mehr lebenden Patienten stammen.

In dem aktuell erschienenen Mutationsupdate wird erneut bestätigt, dass auch durch die Kombination von verschiedenen Methoden (z.B. Southern Blot, SSCP-Analyse, DNA Schmelzkurvenanalyse mittels Fluoreszenzsignal, Sequenzierung der 10 Exons einschließlich angrenzender Intron – Exon Grenzen), nach wie vor Mutationen nur bei ca. 80% der Patienten mit enzymatisch gesichertem OTC-Mangel nachweisbar sind (Yamaguchi *et al.* 2006). Es scheint, als ob auch durch die stete Verbesserung molekulargenetischer Strategien und Anwendung neuer molekulargenetischer Methoden keine deutliche Verbesserung der Detektionsrate erzielt wird. Davon ausgehend, sollten sich neue Ansätze nicht nur methodisch konzentrieren sondern auch mit der Frage auseinandersetzen, was die restlichen 20% der krankheitsverursachenden Mutationen ausmacht. Die Ausweitung der molekulargenetischen Diagnostik auf regulatorische Bereiche des *OTC*-Gens erscheint als sinnvoller Aspekt, da diesbezüglich bisher nur spärliche Informationen in der Literatur zu finden sind. Gestützt müssten diese Analysen durch Expressionsanalysen werden, was vielleicht auch dem besseren Verständnis des variablen klinischen Erscheinungsbildes dienen wird.

## B Familienbesprechung

Dieser Abschnitt umfasst eine eingehende Darstellung der Daten in den Familien, die wir im Rahmen der Diagnostik untersuchten. Insbesondere sollen die molekulargenetischen Befunde in Zusammenhang mit den zur Verfügung stehenden klinischen und biochemischen Angaben diskutiert werden. Eine molekulare Diagnostik zum Mutationsnachweis im *OTC*-Gen wurde bei insgesamt 10 Patienten mit der Verdachtsdiagnose OTC-Mangel und 15 Familienangehörigen durchgeführt. Bei 5 der Patienten, Nr. 54, Nr. 55, Nr. 56, Nr. 57 und Nr. 58, konnte keine Mutation nachgewiesen werden.

Zu den Index-Patienten Nr. 54, Nr. 55 und Nr. 62 stehen keine oder unzulängliche klinische und biochemische Angaben zur Verfügung und der molekulargenetische Befund lässt sich bedauerlicherweise nur unzureichend beurteilen. Gleichzeitig wird hiermit deutlich, welchen Stellenwert gute klinische Informationen in der molekularen Diagnostik haben. Wie nachfolgend gezeigt, sind klinische und biochemische Angaben bei Verdacht auf OTC-Mangel für die zuverlässige Interpretation des molekulargenetischen Befundes unbedingt notwendig. Die variable Genotyp-Phänotyp-Korrelation und die Heterogenität von Mutationen im *OTC*-Gen, bedingen das pleomorphe Krankheitsbild beim OTC-Mangel.

### Indexpatient Nr. 54 und Nr. 55

Bei diesen beiden weiblichen Patientinnen stehen uns weder klinische noch biochemische Angaben zur Verfügung. Das Begleitschreiben enthielt lediglich die Verdachtsdiagnose OTC-Mangel und die Information, dass beide Elternteile gesund seien. In der molekulargenetischen Analyse konnten wir sowohl bei der Patientin Nr. 54 als auch bei Patientin Nr. 55 keine Mutation nachweisen. Diese Konstellation ist in der diagnostischen Praxis nicht selten und stellt in doppelter Hinsicht ein Problem dar.

Zum einen könnte die Verdachtsdiagnose OTC-Mangel aufgrund nur vager klinischer und biochemischer Befunde gestellt worden sein. In diesem Fall wäre der negative Mutationsnachweis als relevanter Normalbefund zu werten. Zum anderen besteht die Möglichkeit, dass es sich um einen falsch-negativen Befund handelt, sprich kein Mutationsnachweis bei Vorliegen der Erkrankung.

Eine Mutation lässt sich nur bei ca. 80% der Personen mit gesichertem OTC-Mangel nachweisen. Bei dringendem klinischen Verdacht auf OTC-Mangel und negativem Mutationsscreening wäre deshalb die Durchführung einer Leberbiopsie zur Bestimmung der OTC-Aktivität zu überdenken.

Unter der Annahme, dass bei den beiden weiblichen Patientinnen tatsächlich ein OTC-Mangel vorliegt, jedoch die verursachende Mutation nicht detektiert werden konnte, würden sich keine sicheren Aussagen bezüglich anderer Familienmitglieder treffen lassen. Die Angabe „Eltern gesund“, ist mit Neumutationen bei den Patientinnen vereinbar. Es wäre aber auch gut möglich, dass die Mütter jeweils heterozygot mit günstiger X-Inaktivierung sind.

Anhand dieser Patientinnen wird deutlich, dass der Befund einer Mutationsanalyse immer kritisch beurteilt werden muss, vor allem wenn es sich wie beim OTC-Mangel, auf Geno- und Phänotyp-Ebene um ein variables Krankheitsbild handelt. Obwohl die Mutationsanalyse bei Verdacht auf OTC-Mangel in die Routinediagnostik vorgedrungen ist, stellt sie bisher nur eine von verschiedenen diagnostischen Maßnahmen dar. Gelingt der Nachweis einer krankheitsverursachenden Mutation nicht, ist die Kombination aus klinischer Diagnostik, inklusiv einer gründlichen Familienanamnese und biochemischer Diagnostik immer von großer Bedeutung.

### **Indexpatient Nr. 56**

Bei diesem Kind kam man aufgrund einer in der zweiten Lebenswoche aufgetretenen enzephalopathischen Krise mit Plasma-Ammoniakwerten bis 400  $\mu\text{mol/l}$ , einer erhöhten Orotsäureausscheidung von 3000 mmol/mol Kreatinin sowie nicht nachweisbarem Citrullin im Plasma-Aminosäureprofil, zu der dringenden Verdachtsdiagnose eines Neonatal-onset OTC-Mangels.

Unter einer mäßigen Eiweißrestriktion und oraler Substitution von Citrullin und Natriumbenzoat fand sich eine Normalisierung der Ammoniakwerte. Der im Verlauf durchgeführte Allopurinoltest war sowohl bei der Patientin als auch der Mutter unauffällig.

In der Familienanamnese fanden sich keine Hinweise auf Stoffwechselerkrankungen. In der molekulargenetischen Untersuchung der Patientin, der Mutter und des Vaters fand sich, bis auf einen heterozygoten Polymorphismus in Exon 2 bei der Mutter, keine DNA-Veränderung; dieser Befund wurde unabhängig von einem weiteren Labor in der Schweiz bestätigt.

Auffallend in diesem Fall war, dass Glutamin zu keinem Zeitpunkt erhöht nachgewiesen werden konnte. Die Glutamin-Konzentration ist der empfindlichste Parameter für eine gestörte Ammoniakentgiftung. Eine Reduktion der Harnstoffbiosynthese führt zu einem Anstieg der Ammoniakkonzentration. Perivenöse Hepatozyten können überschüssiges Ammoniak durch die Glutaminsynthetase an Glutamat, unter Bildung von Glutamin, fixieren. Bei Umgehung der Leber wie beim offenen Ductus venosus Arantii, kann Ammoniak weder zu Harnstoff noch zu Glutamin entgiftet werden. Differentialdiagnostisch kämen bei einem kaum mehr bestimmbar Citrullinspiegel und Fehlen anderer spezifischer Aminosäuren neben dem OTC-Mangel auch der Carbamylphosphatsynthetase oder der N-Acetylglutamatsynthetasemangel in Frage, wobei man bei den beiden letztgenannten keine erhöhte Orotsäureausscheidung erwarten würde.

Insgesamt bleibt die Diagnose in diesem Fall ohne Bestimmung der Enzymaktivität ungeklärt.

### **Indexpatient Nr. 57**

Bei dem zweijährigen Mädchen wurde eine diagnostische Mutationsanalyse des *OTC*-Gens angefordert. Die klinische Vorgeschichte beinhaltet: Zustand nach Schocksyndrom bei Sepsis, Panzytopenie, embolische Hirninfarkte, Tetraspastik, extreme Osteoporose und Erhöhung der Orotsäure im Urin. Wir konnten keine potentiell krankheitsauslösende Mutation nachweisen. Untersuchungsmaterial der Eltern stand nicht zur Verfügung, laut Anforderungsschreiben seien sie gesund. Wenngleich man bei weiblichen Patienten mit OTC-Mangel ein sehr variables klinisches Erscheinungsbild beobachten kann, spricht die klinische Symptomatik nicht dringend für einen OTC-Mangel.

**Indexpatient Nr. 58**

In der molekulargenetischen Analyse des *OTC*-Gens mittels DGGE als Mutationsscreeningverfahren, konnten wir bei dem 49jährigen männlichen Patienten keine DNA-Veränderung detektieren. Aufgrund eines eher unsichern klinischen Verdachts wurde keine weiterführende Diagnostik / Sequenzierung erbeten.

**Indexpatient Nr. 59**

Bei der weiblichen Patientin ergab die molekulargenetische Analyse des *OTC*-Gens die Nonsense-Mutation R23X heterozygot in Exon 1. Sowohl bei den Eltern als auch der Schwester der Patientin konnte diese Mutation nicht nachgewiesen werden.

Die Mutation R23X wurde erstmals von Grompe et al. (1991) beschrieben und führt mit Sicherheit zu einem vollständigen Verlust der Enzymaktivität. Es handelt sich um eine CpG-Mutation im Bereich der Signalsequenz in Exon 1 des *OTC*-Gens.

Bei männlichen Personen ist bei Hemizygotie für R23X eine schwerste neonatale Manifestation anzunehmen. Bei weiblichen Personen ist die Schwere der Krankheit vom Lyonisierungsmuster abhängig. Bei dem Kind wurde im Alter von 2 Jahren und 8 Monaten aufgrund einer Ammoniakerhöhung im Blut, rezidivierenden Erbrechens, Somnolenz und intermittierender Ataxie die Verdachtsdiagnose OTC-Mangel gestellt. Der fehlende Nachweis der Mutation bei der Mutter spricht für eine Neumutation, wie sie bei vielen Mädchen mit heterozygotem OTC-Mangel beobachtet wird. Somit wäre das Risiko für ein weiteres erkranktes Kind gering. Allerdings ist das Vorliegen der Mutation in der Keimbahn der Eltern nicht ausgeschlossen. Der Genotyp der Schwester der Patientin entsprach dem des OTC-Wildtyps; für die Kinder der Schwester ist ein erhöhtes Risiko, von OTC-Mangel betroffen zu sein, auszuschließen.

**Indexpatient Nr. 60**

Bei der Familie konnte mittels molekulargenetischer Analyse des *OTC*-Gens keine potentiell krankheitsauslösende Mutation identifiziert werden, wobei eine klinische Bedeutung der neuen Variante c.-176c>g in der 5'-nicht-translierten Region nicht auszuschließen ist.

Der Indexpatient zeigte eine neonatale Manifestation des OTC-Mangels, an deren Folgen der Junge im Alter von 5 Tagen verstarb.

Gesichert wurde die Diagnose durch Bestimmung der Enzymaktivität in einer Leberbiopsie, die eine Restenzymaktivität von 5  $\mu\text{mol/min/mg}$  Protein zeigte. Der bei der Mutter durchgeführte Allopurinoltest lieferte keinen sicheren Hinweis auf einen möglichen Überträgerstatus. Die Wahrscheinlichkeit, dass die Mutter des betroffenen Knaben Überträgerin ist, ist dennoch groß (Pelet *et al.* 1990; Tuchman *et al.* 1995a).

Die molekulare Diagnose sollte vor allem im Rahmen einer Überträgerdiagnostik für die Familie Sicherheit bringen. Dieses Fallbeispiel lässt die Grenzen der diagnostischen Maßnahmen erkennen.

Da bislang nur etwa 80% der Mutationen bei Patienten mit gesichertem OTC-Mangel identifiziert werden, sollte in diesen Fällen z.B. an eine Mutation in einem der Introns oder in regulatorischen Domänen wie Promotor- oder Enhancer-Sequenzen gedacht werden. Die zunächst bei unserem Indexpatienten und der Mutter festgestellte Sequenzvariante in der Promotorregion des *OTC*-Gens, lässt allenfalls nur eine spekulative Korrelation mit dem Phänotyp zu. Nach aktuellem Kenntnisstand wurde diese Mutation noch nicht beschrieben. In der Literatur sind seit Erscheinen des letzten Mutationsupdates von Tuchman *et al.* [2002] 4 Sequenzvarianten ohne pathogenen Charakter in der 5'-nicht-translierten Region beschrieben; sie betreffen die Nukleotide c.-512, c.-441, c.-365 und c.-339 (Azevedo *et al.* 2003). Um den pathogenen Charakter der Mutation in der regulatorischen Sequenz abschätzen zu können, müsste zunächst bei mindestens 100 gesunden Kontrollpersonen die molekulargenetische Analyse der Promotorregion erfolgen. Läge die Mutation bei keiner Kontrolle vor, könnte dies auf einen pathogenen Effekt der Mutation hindeuten. Circa 1% aller krankheitsverursachenden Punktmutationen sind in der Promotorregion gelegen und können die Genfunktion aufheben oder die Expression verändern (Cooper 2002). Prinzipiell können Mutationen in regulatorischen Domänen, welche konstitutive Promotorelemente, Enhancer, Repressoren, gewebespezifische und andere responsive Elemente enthalten, zu einer quantitativen Änderung der Proteinproduktion führen.

Eine Untersuchung der Genexpression in der Leber bei Vorliegen dieser Sequenzvariante im Bereich der regulatorischen Domäne über den Nachweis des Genproduktes (Protein) oder des Transkriptes (mRNA), könnte Aufschluss geben, ob und wie stark das *OTC*-Gen exprimiert wird.



Unabhängig davon könnte für weitere Nachkommen im Rahmen einer vorgeburtlichen Diagnostik die Analyse von informativen Polymorphismen und der c.-176 Variante (Kopplungsanalyse) angeboten werden, um eine Aussage über das mutationstragende Allel zu treffen. Als ultima ratio bliebe zur Abklärung in einer Schwangerschaft eine fetale Leberbiopsie ab der 20. SSW zur Bestimmung der OTC-Aktivität, welche jedoch mit einem hohen Fehlgeburtsrisiko verbunden wäre.

### **Indexpatient Nr. 61**

Bei dem männlichen Indexpatienten wurde im Alter von 36 Stunden eine Hyperammonämie mit Enzephalopathie festgestellt. Aufgrund einer massiv erhöhten Orotsäure sowie einem nicht nachweisbaren Citrullin, kam man zu der dringenden Verdachtsdiagnose OTC-Mangel. Wir führten bei dem Jungen, der Mutter und der zweijährigen Schwester eine molekulargenetische Analyse der kodierenden Region des *OTC*-Gens und angrenzender Intronabschnitte mittels Denaturierungsgradienten-Elektrophorese (DGGE) und Sequenzanalyse durch (siehe Ergebnisse-Teil C).

Der Indexpatient ist hemizygot für eine komplexe Mutation in Exon 5, formell zu beschreiben als c.410C>G und c.417\_418insTATTG (A137G; A140fs ins). Diese Mutation ist im aktuellen Mutationsupdate noch nicht beschrieben (Yamaguchi *et al.* 2006). Im Heterozygotenstatus konnten wir die Mutation im Rahmen einer Überträgerdiagnostik bei der Mutter und bei der Schwester des Indexpatienten nachweisen. Somit ist der Konduktorinnenstatus der Mutter gesichert. Der genaue Entstehungsmechanismus dieser Mutation ist unklar. Die Mutation verursacht eine Verschiebung des Leserahmens und führt damit höchst wahrscheinlich zu einem völligen Verlust der OTC Enzymaktivität. In unserem Fall lässt sich die schwere neonatale Manifestation des OTC-Mangels bei dem Jungen mit der Schwere der Mutation in Einklang bringen. Obwohl sowohl die Mutter als auch die Schwester des Indexpatienten den selben Genotyp haben, ist die Ausprägung des Phänotyps unterschiedlich.

Die Mutter ist klinisch gesund, die Schwester hat eine Late-onset Form des OTC-Mangels. Dies ist mit großer Sicherheit Ausdruck eines ungleichen Musters der X-Chromosom-Inaktivierung. Vermutlich erfolgt bei der Mutter die Expression des *OTC*-Gens zugunsten des Wildtyp (gesunden)-Allels, während bei der Schwester die Expression zugunsten des mutanten Allels erfolgt.

Dieser Fallbericht zeigt beispielhaft, wie variabel - von Gesund über Late-onset-Manifestation bis schwere neonatale Manifestation - das klinische Erscheinungsbild in derselben Familie sein kann. In dieser Familie wäre aufgrund der molekularen Diagnose, eine Pränataldiagnostik ohne Probleme möglich. Eine Voraussage bezüglich der klinischen Schwere der Erkrankung ließe sich bei einem weiblichen Feten jedoch nicht treffen.

### Indexpatient Nr. 62

Mit der Verdachtsdiagnose OTC-Mangel erhielten wir Probematerial zur molekulargenetischen DNA-Analyse einer ungarischen Familie; mit Indexpatientin, Mutter und Vater. Uns wurden weder biochemische noch klinische Angaben zu dem Erkrankungsverlauf der Patientin gegeben. Wir identifizierten bei der Analyse des *OTC*-Gens mittels DGGE und Sequenzierung heterozygot bei der Patientin die Mutation E239D in Exon 7. In der DNA-Analyse der Mutter und des Vaters fand sich an entsprechender Position der Wildtyp. Die Mutation E239D ist bisher noch nicht

Konsensussequenz der Spleißdonorstelle	Exon	Intron	beschrieben worden. Aus der Substitution der Base Guanin durch Tyrosin (GAG→GAT) an dritter Position in Codon 239 lässt sich ein Aminosäure-
	CAG A	GTAAAGT G	
OTC-Wildtyp (62.2/3)	GAG	GTATGC	Position in Codon 239 lässt sich ein Aminosäure-
c.717G>T	GAT	GTATGC	

**Bild 4-1** Vergleich der Konsensussequenz der Spleißdonorstelle mit der 5'-Spleißdonorstellensequenz von Intron 7 bei Wildtyp und Mutation c.717G>T.

austausch von Glutamat zu Aspartat ableiten. Allerdings betrifft die Mutation das letzte Nukleotid in Exon 7, und es ist bekannt, dass solche Mutationen das korrekte Spleißen des Introns beeinträchtigen oder verhindern können. Die Substitution der Base G nach A an gleicher Position, die jedoch keinen Aminosäureaustausch bewirkt, wurde von Tuchman et al. [1997] beschrieben und ist im Mutationsupdate von Tuchman et al. [2002] und Yamaguchi et al. [2006] als Donor-Splice-Site Mutation enthalten. Der Mechanismus des RNA-Spleißens beruht auf dem Erkennen von Nucleotidsequenzen, die die Exon-Intron-Grenzen (Spleißstelle) bilden. Hierfür ist die GT-AG-Regel von besonderer Bedeutung: Introns beginnen immer mit GT (=Spleißdonorstelle) und enden mit AG (=Spleißakzeptorstelle). Bei den angrenzenden Nukleotiden hängt die Wahrscheinlichkeit für erfolgreiches Spleißen von der Gesamtsequenz der Region ab.

78 Prozent der Exons von Säugetieren enden mit der Base Guanin (G) und im *OTC*-Gen endet praktisch jedes Exon mit der Base G (Shapiro *et al.* 1987). Ungefähr 13 Prozent der Mutationen im *OTC*-Gen betreffen Konsensuspleißstellen im Intron oder das letzte Nukleotid im Exon (Tuchman *et al.* 2002). Mutationen an Spleißstellen können durch Verlust des Spleißens bzw. Verwendung kryptischer Spleißstellen, zu abgewandelten Exons oder Überspringen von Exons führen. In unserem Fall könnte die Mutation E239D das Spleißen von Intron 7 unterdrücken und somit zum Ablesen der Intronsequenz führen, insbesondere weil das Intron 7 mit einer Größe von 80 Basen sehr kurz ist. In diesem Fall könnte es zu einer Übernahme der Intronsequenz in die reife mRNA kommen. Andererseits ist auch das Überspringen von Exons, in diesem Fall von Exon 7, möglich. Beide Effekte würden wahrscheinlich mit einem völligen Funktionsverlustes des Proteins einhergehen. Welchen Einfluss die Mutation auf den Spleißvorgang jedoch im Einzelfall ausübt, lässt sich nur durch cDNA-Analysen klären.

### **Indexpatient Nr. 63**

Der eindrucksvolle klinische Verlauf bei diesem Patienten gewährt einen Einblick in die Heterogenität des Krankheitsbildes OTC-Mangel. Bei diesem Kind sprachen die klinischen und biochemischen Befunde für das Vorliegen einer Late-onset Form des OTC-Mangels. Bei männlichen Patienten kann es zu einer Manifestation des OTC-Mangels nach der Neugeborenenperiode kommen, wenn eine hemizygote Mutation vorliegt, die eine gewisse Restenzymaktivität gewährt. Dabei gibt es wie bei heterozygoten Anlageträgerinnen eine große Variabilität sowohl hinsichtlich des Manifestationszeitpunktes der Erkrankung als auch der jeweiligen Enzymaktivität (McCullough *et al.* 2000). Die Aufklärung der Tertiärstruktur der humanen OTC sowie der Vergleich der Aminosäuresequenz der OTC von über 30 verschiedenen Spezies, lässt Spekulationen bezüglich des pathogenen Effektes einer Mutation zu. So genannte „milde Mutationen“ mit Restenzymaktivität wie zum Beispiel R40H, Q180H, F354C, sind häufig durch einen Aminosäureaustausch in Domänen abseits des aktiven Zentrums oder auf der Oberfläche des Proteins bedingt.

Die molekulargenetische Untersuchung des *OTC*-Gens des Patienten lieferte einen überraschenden Befund. In der DGGE-Analyse der DNA aus Vollblut, Fibroblasten und Lymphozyten, fand sich bei dem Knaben ein auffälliges Bandenmuster in Exon 10, welches mit 2 Homo- und 2 Heteroduplexbanden dem Bild eines heterozygoten Patienten entsprach. Die restlichen Exons zeigten Banden, welche einem Wildtyp entsprechen. In der DGGE-Analyse der DNA aus Vollblut von den Eltern war jeweils eine Wildtypbande nachweisbar. Normalerweise findet man bei einem hemizygoten männlichen Patienten nur eine Bande. Der hier vorliegende Befund sprach dagegen für das Vorliegen von zwei unterschiedlichen Allelen, was zunächst nicht zu einem männlichen Chromosomensatz mit nur einem X-Chromosom passt. Als Erklärung des Befundes kamen zwei Möglichkeiten in Frage: zum einen eine gonosomale Chromosomenstörung mit einem überzähligen X-Chromosom wie das Klinefelter Syndrom (XXY), oder zum anderen ein somatisches Mosaik. Die Chromosomenanalyse bei dem Patienten ergab einen unauffälligen männlichen Karyotyp (46, XY), was für die zweite Möglichkeit sprach.

In der nachfolgenden direkten Sequenzanalyse von Exon 10, wurde die bisher noch nicht beschriebene Mutation X355L in scheinbar heterozygoter Form bei dem Knaben detektiert. Die Sequenzanalyse der Eltern ergab an entsprechender Position den Wildtyp. Das STOP-Codon Nr. 355 wird durch die Aminosäure Leucin ersetzt, wodurch ein um 14 zusätzliche Aminosäuren verlängertes Translationsprodukt am C-terminalen Ende entsteht, welches vermutlich die Proteinstruktur verändert.

Interessanterweise zeigten Mutation und Wildtyp sowohl in der DGGE als auch der Sequenzierung Unterschiede in der relativen Intensität in unterschiedlichen Geweben. Im DGGE erscheint die mutante Homoduplexbande in Vollblut stärker, während in Fibroblasten die Intensität nicht unterschiedlich erscheint. Auch die Sequenzanalyse zeigte im Vollblut eine unterschiedliche Peakhöhe zugunsten des mutanten Allels, während in der Sequenzanalyse aus Fibroblasten die Peakhöhe nahezu identisch war. Diese Befunde belegen das Vorliegen eines somatischen Mosaiks: Die Existenz von zwei unterschiedlichen Zellpopulationen - eine mit der Mutation und eine ohne - ist in diesem Fall nur durch eine postzygotische Mutation zu erklären, die durch einen Mitosefehler in der frühen Embryogenese in einer pluripotenten Stammzelle aufgetreten ist.

Die identifizierte Verteilung in den beiden untersuchten Geweben lässt jedoch keine Rückschlüsse auf die Verteilung in anderen Geweben zu. Für die genetische Beratung der Eltern ergibt sich jedoch die wichtige Konsequenz, dass ein Wiederholungsrisiko durch ein Keimbahnmosaik für zukünftige Kinder auszuschließen ist.

Aufgrund des Versterbens des Kindes an den Folgen eines hyperammonämischen Komas, hat die Frage, welche Konsequenz sich aus der Mutation für die eigenen Nachkommen ergeben hätte, nur theoretischen Wert. Weibliche Nachkommen wären mit einer Wahrscheinlichkeit von vermutlich ca. 50% heterozygote Träger der Mutation geworden, während Söhne nicht betroffen gewesen wären.

In zwei vorausgegangenen Publikationen wurde das Vorliegen eines Mosaiks bei Jungen mit einer Deletion im *OTC*-Gen als Ursache für die Late-onset Form des OTC-Mangels angenommen (Maddalena *et al.* 1988; Legius *et al.* 1990). Auch der hier beschriebene Fall demonstriert, dass eine Late-onset Form des OTC-Mangels bei männlichen Patienten sowohl durch eine Mutation mit resultierender Restaktivität als auch durch das Auftreten eines somatischen Mosaiks verursacht werden kann.

## C Schlußbetrachtung

Die molekulargenetische Diagnostik ist mittlerweile als fester Bestandteil in die Diagnosesicherung des OTC-Mangel eingegangen. In der vorliegenden Dissertation wurde die DGGE mit anschließender Sequenzanalyse als hochsensitives und kosteneffizientes Mutationsanalyseverfahren beim OTC-Mangel vorgestellt. Die gleichzeitige Analyse mehrerer Probandengruppen ermöglicht einen großen Probendurchlauf mit insgesamt kurzer Analysedauer. Neben dem Nachweis einzelner Basensubstitutionen gelang auch die Detektion von Deletionen, Insertionen sowie eines genomischen Mosaiks. In der DGGE können genetische Varianten bei männlichen Individuen hemizygot und bei weiblichen Individuen heterozygot sowie homozygot nachgewiesen werden. Da mit der DGGE zunächst keine genaue Charakterisierung der detektierten Veränderung möglich ist, ergibt sich die Notwendigkeit der Sequenzanalyse, die jedoch auf die Exons beschränkt werden kann, in denen sich im DGGE ein auffälliges Bandenmuster fand. Der Ansatz erfüllt die Anforderung, aus Qualitätssicherungsgründen eine Mutation in zwei unabhängigen Methoden nachzuweisen. Eine umfassende Sequenzanalyse des *OTC*-Gens kann bei unauffälliger DGGE sowie klinisch und biochemisch fundierten Verdachtsdiagnose eines OTC-Mangels sinnvoll sein.

Eine fundierte Interpretation der Befunde ist erheblich erschwert oder unmöglich, wenn Angaben zum klinischen Bild bzw. Krankheitsverlauf unzureichend sind oder fehlen. Die Durchführung einer molekularen Diagnostik sollte immer im Kontext mit der klinischen Symptomatik und auffälligen biochemischen Befunde stehen.

## Aussichten

Im 20. Jahrhundert hat das Wissen um die Struktur des menschlichen Genoms unser Bild über das Entstehen von Krankheiten außerordentlich verändert. Die Erkenntnis formalgenetischer Aspekte beim Menschen im letzten Jahrhundert hatte erstmals wissenschaftlich begründete Aussagen zur Wahrscheinlichkeit des Auftretens erblich bedingter Erkrankungen erlaubt. Die Fortschritte der Molekulargenetik führen nun zu einem wachsenden Verständnis der molekularen Grundlagen von Krankheiten und eröffnen Möglichkeiten der bestätigenden oder prädiktiven Diagnostik. Die Tatsache, dass immer mehr genetische Faktoren voraussehbar werden, ruft nach globalem Verantwortungsbewusstsein. Im Februar 2001 wurde die Bestimmung der DNA-Sequenz des Menschen als Meilenstein in der Medizin gefeiert. Das humane Genom umfasst mehr als  $3 \times 10^9$  Basenpaare und circa 20 000-25 000 Gene. Aus dem Projekt, in dem es galt, Base für Base zu lesen und aufzuzeichnen, ist ein Projekt mit vielfältigen Forschungsansätzen zur Aufklärung der Genfunktion geworden, welche zu einem besseren Verständnis der Krankheitsursachen und besseren Therapien führen sollen.

Erbliche Stoffwechselerkrankungen sind Paradigmen für monogene Erbkrankheiten, in welchen ein Gen für ein Protein kodiert. Aber treten diese Erkrankungen mit einem Phänotyp auf? Wie beim Ornithintranscarbamylase-Mangel als monogener Erkrankung gezeigt, kann der Phänotyp einer multifaktoriell bedingten Erkrankung entsprechen. Als Ursache konnten in dieser Arbeit neben einem durch die jeweilige Mutation bedingten unterschiedlichen Genotyp, die X-Chromosom-Inaktivierung, das Vorliegen eines somatischen Mosaiks sowie externe Faktoren wie die Stoffwechselsituation oder Ernährung gezeigt werden. Neben diesen Faktoren werden noch andere, bisher unverstandene Einflüsse angenommen, welche sich auf die Ausprägung des Phänotyps auswirken. Beispielsweise wurde von Ausems und Kollegen ein Fall demonstriert, bei denen die Mutation A208T, bei vergleichbar niedrig gemessenen Enzymaktivitäten innerhalb einer Familie, zu einer extremen Variation des Phänotyps, von klinisch asymptomatisch bis Versterben im Neugeborenenalter, führte (Ausems *et al.* 1997).

Weitere Mutationen im *OTC*-Gen, bei denen das Alter der Erstmanifestation des OTC-Mangels sehr variabel ist, sind beispielsweise R40H (Manifestationen mit 2, 11, 18 und 37 Jahren beschrieben) und P225T (Manifestationen mit 8 und 62 Jahren beschrieben). Die Beeinflussung der Expression durch bisher nicht bekannte genetische Faktoren und Umwelteinflüsse sollte Gegenstand weiterer Untersuchungen sein.

Trotz intensiver Bemühungen gelingt es aktuell nicht, bei allen Patienten mit gesichertem OTC-Mangel Mutationen zu identifizieren. Dieses Missverhältnis wird sich hoffentlich in der nächsten Zeit durch neue Erkenntnisse bereinigen lassen. Eine sich an diese Arbeit anschließende mögliche Fragestellung wäre zum Beispiel, ob der Anteil an Deletionen oder Duplikationen im *OTC*-Gen wirklich so gering ist, wie bisher angenommen. Insbesondere bei heterozygoten Patientinnen ist der Nachweis von Deletionen eines oder mehrerer Exons erschwert, wenn das mutante Allel kein Produkt liefert und somit scheinbar nur das Wildtyp-Allel dargestellt wird. Da männliche Patienten normalerweise hemizygot für X-chromosomale Gene sind, d.h. nur ein Allel vorhanden ist, gestaltet sich der Nachweis von Deletionen in der Regel weniger problematisch. Auch hier wird eine größere Deletion oder Duplikation jedoch mit Standardmethoden nicht nachgewiesen, wenn ein somatisches Mosaik oder ggf. eine Kontamination vorliegt. Die Anwendung der MLPA-Analyse (Multiplex-ligation-dependent probe amplification) könnte darauf eine Antwort geben. Mit dieser Methode kann man quantitativ die Anzahl der vorliegenden Zielsequenzen bestimmen (Schouten *et al.* 2002). Für zahlreiche Gene wie beispielsweise das Dystrophin-Gen oder BRCA1-Gen, hat sich diese Technik bewährt (Janssen *et al.* 2005, Gatta *et al.* 2005, Hartmann *et al.* 2004, Hogervorst *et al.* 2003).

In einem aktuellen Fallbericht wurde auf die Bedeutung der Chromosomenanalyse als Bestandteil der genetischen Analyse bei Patienten mit OTC-Mangel hingewiesen. In diesem wurde bei monozygoten weiblichen Zwillingen mit schweren neonatalem OTC-Mangel eine balancierte reziproke Translokation t(X;5)(p21.1;q11) als Ursache festgestellt, welche das *OTC*-Gen auf einem X-Chromosom zerstörte (Zenker *et al.* 2005).



Festzuhalten ist jedoch, dass die Mutationsdetektionsrate seit vielen Jahren trotz Einsatzes fortschrittlicher Analyseverfahren und Kombination verschiedener Techniken nicht verbessert werden konnte. Es ergibt sich die Frage, ob sich das Defizit wirklich durch methodische Lücken ergibt oder aber der Einfluss zusätzlicher, bislang unbekannter Faktoren zu wenig Beachtung fand. Dieses Bild könnte sich schon durch die Ausweitung der Untersuchung auf die Promotorregion in Kombination mit Expressionsanalysen wandeln.

Die Durchführung einer molekulargenetischen Untersuchung bei Verdacht auf OTC-Mangel ist von großer Bedeutung für die nicht-invasive Sicherung der Diagnose sowie für die Durchführung einer Pränataldiagnostik. Die Bestimmung der Enzymaktivität aus Lebergewebe ist dagegen an eine Punktion geknüpft. Der Mutationsnachweis ermöglicht auch bei bisher asymptomatischen Verwandten eines Indexpatienten eine frühe Diagnose und nachfolgend eine gezielte Intervention zur Vermeidung von potentiell letalen Stoffwechselkrisen. Die Erkenntnisse aus Mutationsanalysen führen auch zu einem besseren Verständnis der Erkrankung, woraus sich hoffentlich auch therapeutische Konsequenzen ableiten lassen.

## V Zusammenfassung

Die Ornithintranscarbamylase (EC 2.1.3.3) dient als mitochondriales Matrixenzym im zweiten Schritt des Harnstoffzyklus der Umwandlung von Ornithin und Carbamylphosphat zu Citrullin. Die Hauptaufgabe des Harnstoffzyklus ist die Bildung von Harnstoff als unschädlichem Stickstoffausscheidungsprodukt. Ist die Aktivität dieses Stoffwechselweges eingeschränkt, resultiert eine Akkumulation von Stickstoff in Form des neurotoxischen Ammoniaks in Blut und Gewebe. Das klinische Bild beim OTC-Mangel ist sehr variabel und reicht von einem akuten, oft letalen neonatalen hyperammonämischen Koma bis zum klinisch asymptomatischen Erwachsenen.

Der OTC-Mangel ist mit 1:14.000 der häufigste angeborene Harnstoffzyklusdefekt und wird X-chromosomal vererbt. Das humane *OTC*-Gen ist auf dem kurzen Arm des X-Chromosoms (Xp21.1) lokalisiert, 73 kb groß und enthält 10 Exons und 9 Introns. Es unterliegt der X-Chromosom-Inaktivierung bei Frauen.

Ziel der vorliegenden Studie war die Etablierung und Evaluierung der Denaturierungsgradientengel-Elektrophorese (DGGE) als hochsensitivem praktikablen Screeningverfahren in der Routinediagnostik zur Mutationsanalyse im *OTC*-Gen. Im ersten Schritt erfolgte bei 53 bereits typisierten DNA-Proben aus 3 Patientenkollektiven die Mutationsanalyse der gesamten kodierenden Region des *OTC*-Gens und angrenzender Intronabschnitte mittels DGGE. Zur genauen Charakterisierung einer detektierten Veränderung erfolgte die exonspezifische Sequenzierung. Es konnten alle 48 gesuchten Mutationen nachgewiesen werden; bei 5 von 5 Negativproben wurde das Fehlen einer krankheitsauslösenden Mutation bestätigt. Daraus ergibt sich für diese Untersuchung eine Sensitivität von 100 Prozent. Insgesamt wurden mittels DGGE 36 unterschiedliche Mutationen nachgewiesen: 24 Missense-Mutationen, 5 Nonsense-Mutationen, 4 Donorsplicesite-Mutationen sowie 2 Insertionen und 1 Deletion.

Im zweiten Schritt führten wir bei 10 Patienten mit Verdacht auf OTC-Mangel sowie 15 Familienangehörigen eine molekulargenetische Diagnostik mittels DGGE als Screeningverfahren und exonspezifischer Sequenzierung oder ggf. Sequenzanalyse der gesamten kodierenden Region des *OTC*-Gens und angrenzender Intronabschnitte sowie der 5'-nicht-translierten Region durch.

Bei 5 Patienten mit nicht gesichertem OTC-Mangel konnte keine Mutation nachgewiesen werden. Bei einem Patienten mit enzymatisch gesichertem OTC-Mangel wurde in der 5'UTR die noch nicht beschriebene Sequenzvariante c.-176c>t nachgewiesen. Bei 4 Patienten haben wir potentiell krankheitsverursachende Mutationen nachgewiesen, welche bis auf die Mutation R23X noch nicht beschrieben worden sind. Es handelt sich dabei um die bereits bekannte Mutation R23X in Exon 1, sowie c.417\_418insTATTG neben A137G in Exon 5, E239D in Exon 7 sowie die Mutation X355L in Exon 10 bei einem männlichen Patienten mit einem genomischen Mosaik.

Neben dem Nachweis einzelner Basensubstitutionen sowohl hemizygot bei männlichen Individuen als auch heterozygot bzw. homozygot bei weiblichen Individuen, gelang auch die Detektion von Deletionen, Insertionen sowie eines genomischen Mosaiks. Aufgrund der Hemizygotie bei männlichen Patienten, sollte zur Sicherstellung einer hohen Sensitivität eine Mischung der Probe mit Wildtyp-DNA erfolgen. Da mit der DGGE zunächst keine genaue Charakterisierung der detektierten Veränderung möglich ist, ergibt sich die Notwendigkeit der Sequenzanalyse, die jedoch auf die Exons beschränkt werden kann, in denen sich im DGGE ein auffälliges Bandenmuster fand. Der Ansatz erfüllt die Anforderung, aus Qualitätssicherungsgründen eine Mutation in zwei unabhängigen Methoden nachzuweisen. Dennoch kann im Einzelfall eine umfassende Sequenzanalyse des *OTC*-Gens trotz unauffälliger DGGE bei klinisch und biochemisch fundiertem dringenden Verdachts auf einen OTC-Mangel sinnvoll sein. Mittels DGGE und nachfolgender Sequenzanalyse erscheint es möglich, die detektierbaren krankheitsverursachenden Mutationen vollständig nachzuweisen.

Trotz intensiver Bemühungen konnte die Mutationsdetektionsrate von bisher 80% bei Patienten mit gesichertem OTC-Mangel bislang nicht gesteigert werden. Es scheint möglich, dass einige Patienten Mutationen in der Promotorregion haben. Die Ausweitung der Mutationsanalyse auf die Promotorregion wäre sinnvoll, um wichtige regulatorische Elemente des Genes zu identifizieren und die Beeinflussung der Expression zu untersuchen. Des Weiteren könnte man durch mRNA Analysen aus Lebergewebe weitere Informationen, beispielsweise Splice-Fehler aufgrund von intronischen Varianten, gewinnen.

## VI Literaturverzeichnis

- Allewell NM, Shi D, Morizono H, Tuchman M. Molecular recognition by ornithine and aspartate transcarbamylase. *Acc Chem Res* 1999;**32**:885-894
- Aoki Y, Sunaga H, Suzuki KT. A cadmium-binding protein in rat liver identified as ornithine carbamoyltransferase. *Biochem J* 1988;**250**:735-742
- Arranz JA, Riudor E, Rodes M, Roig M, Climent C, Rubio V, Sentis M, Burlina A. Optimization of allopurinol challenge: sample purification, protein intake control, and the use of orotidine response as a discriminative variable improve performance of the test for diagnosing ornithine carbamoyltransferase deficiency. *Clin Chem* 1999;**45**:995-1001
- Ausems MGEM, Bakker E, Berger R, Duran M, van Diggelen OP, Keulemans JLM, de Valk HW, Kneppers ALJ, Dorland L, Eskes PF, Beemer FA, Poll-The BT, Smeitink JAM. Asymptomatic and Late-onset ornithine transcarbamylase deficiency caused by a A208T mutation: Clinical, biochemical and DNA analyses in a four-generation family. *Am J Med Genet* 1997;**68**:236-239
- Azevedo L, Stolnaja L, Tietzeova E, Hrebicek M, Hrubá E, Vilarinho L, Amorim A, Dvorakova L. New polymorphic sites within ornithine transcarbamylase gene: population genetics studies and implications for diagnosis. *Mol Genet Metab* 2003;**78**:152-157
- Baig MMA, Swamy HM, Hassan SI, Zaman TU, Ayesha Q, Devi BG. Studies on urea cycle enzyme levels in the human fetal liver at different gestational ages. *Pediatr Res* 1992;**31**:143
- Bowling F, McGown I, McGill J, Cowley D, Tuchmann M. Maternal gonadal mosaicism causing ornithine transcarbamylase deficiency. *Am J Med Genet* 1999;**85**:452-454
- Brusilow W, Tinker J, Batshaw ML. Amino acid acylation: A mechanism of nitrogen excretion in inborn errors of urea synthesis. *Science* 1980;**207**:659
- Brusilow SW, Horwich AL (1995). Urea cycle enzymes. In Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D (eds): *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*, 7<sup>th</sup> ed. New York: Mc Graw-Hill, 1187-1232
- Brusilow SW, Horwich AL (2000). Urea cycle enzymes. In: Scriver CR, Beaudet AL, Valle D, Sly WS, Childs Kinzler Vogelstein (eds): *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*. New York: McGraw-Hill, 1909-1963
- Burlina AB, Ferrari V, Dionisi-Vici C, Bordugo A, Zacchello F, Tuchman M. Allopurinol Challenge Test in Children. *J Inher Metab Dis* 1992;**15**:707-712

- Climent C, Rubio V. H intragenetic polymorphisms and haplotype analysis in the ornithine transcarbamylase (OTC) gene and their relevance for tracking the inheritance of OTC deficiency. *Hum Mutat* 2002;**20**:407-408
- Cooper DN. Human gene mutation in pathology and evolution. *J Inherit Metab Dis* 2002;**25**:157-182
- Cotton RG and Scriver CR. Proof of “disease causing” mutation. *Hum Mutat* 1998;**12**:1-3
- Cotton RG. Methods in clinical molecular genetics. *Eur J Pediatr* 2000;**159**:179-82
- Finkelstein JE, Hauser ER, Leonard CO, Brusilow SW. Late onset ornithine transcarbamylase deficiency in male patients. *J Pediatr* 1990a;**117**:897-902
- Finkelstein JE, Francomano CA, Brusilow SW, Traystman MD. Use of denaturing gradient gel electrophoresis for detection of mutation and prospective diagnosis in late onset ornithine transcarbamylase deficiency. *Genomics* 1990b;**7**:167-172
- Fischer SG and Lerman LS. Length-independent separation of DNA restriction fragments in two-dimensional gel electrophoresis. *Cell* 1979;**16**:191-200
- Fletcher JM, Couper R, Moore D, Coxon R, Dorney S. Livertransplantation for citrullinaemia improves intellectual function. *J Inherit Metab Dis* 1999;**22**:581-586
- Gatta V; Scarciolla O; Gaspari AR; Palka C; De Angelis MV; Di Muzio A; Guanciali-Franchi P; Calabrese G; Uncini A; Stuppia L. Identification of deletions and duplications of the DMD gene in affected males and carrier females by multiple ligation probe amplification (MLPA). *Hum Genet* 2005;**117**:92-98
- Goldsmith JD and Kuo LC. Utilization of conformational flexibility in enzyme activities-linkage between binding isomerization and catalysis. *J Biol Chem* 1993;**268**:18481-18484
- Grompe M, Muzny DM, Caskey CT. Scanning detection mutations in human ornithine transcarbamylase by chemical mismatch cleavage. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989;**86**:5888-5892
- Grompe M, Caskey CT, Fenwick RG. Improved Molecular Diagnostics for Ornithine Transcarbamylase Deficiency. *Am J Hum Genet* 1991;**48**:212-222
- Grünewald S, Fairbanks L, Genet S, Cranston T, Hüsing J, Leonard JV, Champion MP. How reliable is the allopurinol load in detecting carriers for ornithine transcarbamylase deficiency? *J Inher Metab Dis* 2004;**27**:179-186
- Ha Y, McCann MT, Tuchman M, Allewell NM. Substrate-induced conformational change in a trimeric ornithine transcarbamoylase. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 1997;**94**:9550-9555

- Hartmann C; John AL; Klaes R; Hofmann W; Bielen R; Koehler R; Janssen B; Bartram CR; Arnold N; Zschocke J. Large BRCA1 gene deletions are found in 3% of German high-risk breast cancer families. *Hum Mutat* 2004;**24**:534
- Hasegawa T, Tzakis AG, Todo S, Reyes J, Nour B, Finegold DN, Starzl TE. Orthotopic liver transplantation for ornithine transcarbamylase deficiency with hyperammonemic encephalopathy. *J Pediatr Surg* 1995;**30**:863-865
- Hata A, Tsuzuki T, Shimada K, Takiguchi M, Mori M, Matsuda I. Isolation and characterization of the human ornithine transcarbamylase gene: Structure of the 5'-End Region. *J Biochem* 1986;**100**:717-725
- Hata A, Tsuzuki T, Shimada K, Takiguchi M, Mori M, Matsuda I. Structure of the human ornithine transcarbamylase gene. *J Biochem* 1988;**103**:302-308
- Hauser ER, Finkelstein JE, Valle D, Brusilow SW. Allopurinol-Induced Orotidinuria: A test for mutations at the ornithine carbamoyltransferase locus in women. *N Engl J Med* 1990;**322**:1641-1645
- Hogervorst FB; Nederlof PM; Gille JJ; McElgunn CJ; Grippeling M; Prunzel R; Regnerus R; van Welsem T; van Spaendonk R; Menko FH; Kluijdt I; Dommering C; Verhoef S; Schouten JP; van't Veer LJ; Pals G. Large genomic deletions and duplications in the BRCA1 gene identified by a novel quantitative method. *Cancer Res* 2003;**63**:1149-53
- Horslen SP, McCowan TC, Goertzen TC, Warkentin PI, Cai HB, Strom SC, Fox JJ. Isolated hepatocyte transplantation in an infant with a severe urea cycle disorder. *Pediatrics* 2003;**111**:1262-1267
- Horwich AL, Fenton WA, Williams KR, *et al.* Structure and expression of a complementary DNA for the nuclear coded precursor of human mitochondrial ornithine transcarbamylase. *Science* 1984;**224**:1068-1074
- Horwich AL, Kalousek F, Mellman I, Rosenberg LE. A leader peptide is sufficient to direct mitochondrial import of a chimeric protein. *EMBO J* 1985a;**4**:1129-1135
- Horwich AL, Kalousek F, Rosenberg LE. Arginine in the leader peptide is required for both import and proteolytic cleavage of a mitochondrial precursor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985b;**82**:4930-4933
- Horwich AL, Kalousek F, Fenton WA, Pollock RA, Rosenberg LE. Targeting of Pre-Ornithine transcarbamylase to mitochondria: Definition of critical regions and residues in the leader peptide. *Cell* 1986;**44**:451-459
- Janssen B; Hartmann C; Scholz V; Jauch A; Zschocke J. MLPA analysis for the detection of deletions, duplications and complex rearrangements in the dystrophin gene: potential and pitfalls. *Neurogenetics* 2005;**6**:29-35

- Jin L, Seaton BA and Head JF. Crystal structure at 2.8Å resolution of anabolic ornithine transcarbamylase from *Escherichia coli*. *Nat Struct Biol* 1997;**4**:622-625
- Kalousek F, Francois B, Rosenberg LE. Isolation and characterization of ornithine transcarbamylase from normal human liver. *J Biol Chem* 1978;**253**:3939-44
- Killenberg PG, Webster LT. Conjugation by peptide bond formation. In Jacoby WB (ed). *Enzymatic Basis of Detoxication*. New York: Academic 1980, vol 2, p 141
- Kraus JP, Hodges PE, Williamson CL, Horwich AL, Kalousek F, Williams KP and Rosenberg LE. A cDNA clone for the precursor of rat mitochondrial ornithine transcarbamylase: comparison of rat and human leader sequences and conservation of catalytic sites. *Nucleic Acids Res* 1985;**13**:943-952
- Kuo LC, Caron C, Lee S, Herzberg W. Zn<sup>2+</sup> regulation of ornithine transcarbamoylase. II. Metal binding site. *J Mol Biol* 1990;**211**:271-280
- Legius E, Baten E, Stul M, Marynen P, Cassiman JJ. Sporadic late onset ornithine transcarbamylase deficiency in a boy with somatic mosaicism for a n intragenetic deletion. *Clin Genet* 1990;**38**:155-159
- Leonard JV, McKiernan PJ. The role of liver transplantation in urea cycle disorders. *Mol Genet Metab* 2004;**81**:74-78
- Lewis HB. Studies in the synthesis of hippuric acid after benzoat ingestion in man. *J Biol Chem* 1914;**18**:225
- Lindgren V, Martinville B, Horwich AL, Rosenberg LE, Franke U. Human ornithine transcarbamylase locus mapped to band Xp21.1 near the Duchenne muscular dystrophy locus. *Science* 1984;**226**:698-700
- Lyon MF. Gene action in the X chromosom of the mouse (*Mus musculus* L.). *Nature* 1961;**190**:372-373
- Maestri NE, Hauser ER, Bartholomew D, Brusilow SW. Prospektive treatment of urea cycle disorders. *J Pediatr* 1991;**119**:923-8
- Maestri NE, McGowan KD, Brusilow SW. Plasma glutamine concentration: A guide in the Management of urea cycle disorders. *J Pediatr* 1992;**121**:259
- Maestri NE, Lord C, Glynn M, Bale A, Brusilow SW. The phenotype of ostensibly healthy women who are carriers for ornithine transcarbamylase deficiency. *Medicine (Baltimore)* 1998;**77**:389-397
- Maestri NE, Clissold D, Brusilow SW. Neonatal onset ornithine transcarbamylase deficiency: A retrospective analysis. *J Pediatr* 1999;**134**:268-272
- Maddalena A, Sosnoski DM, Berry GT, Nussbaum RL. Mosaicism for an intragenic deletion in a boy with mild ornithine transcarbamylase deficiency. *N Engl J Med* 1988;**319**:999-1003

- Marshall M and Cohen PP. The essential sulfhydryl group of ornithine transcarbamylase. *J Biol Chem* 1980;**255**:7296-7300
- Matsuura T, Hoshide R, Setoyama C, Shimada K, Hase Y, Yanagawa T, Kajita M, Matsuda I. For novel gene mutations in five Japanese male patients with neonatal or late onset OTC deficiency: application of PCR-single-strand conformation polymorphism for all exons and adjacent introns. *Hum Genet* 1993;**92**:49-56
- Matsuura T, Hoshide R, Kiwaki K, Komaki S, Koike E, Endo F, Oyanagi K, Suzuki Y, Kato I, Ishikawa K, Yoda H, Kamitani S, Sakai Y, Matsuda I. Four newly identified ornithine transcarbamylase (OTC) mutations (D126G, R129H, I172M and W332X) in Japanese male patients with early-onset OTC deficiency. *Hum Mutat* 1994;**3**:402-406
- Mavinakere M, Morizono H, Shi D, Allewell NM, Tuchman M. The clinically variable R40H mutant ornithine carbamoyltransferase shows cytosolic degradation of the precursor protein in CHO cells. *J Inherit Metab Dis* 2001;**24**:614-622
- McCullough BA, Yudkoff M, Batshaw ML, Wilson JM, Raper SE, Tuchman M. Genotype spectrum of ornithine transcarbamylase deficiency: Correlation with the clinical and biochemical phenotyp. *Am J Med Genet* 2000;**93**:313-319
- McDowall S, van Heeswijck R, Hoogenraad N. Site-directed mutagenesis of Arg60 and Cys271 in ornithine transcarbamylase from rat liver. *Protein Eng* 1990;**4**:73-77
- Moldave K, Meister A. Synthesis of phenylacetylglutamine by human tissue. *J Biol Chem* 1957;**229**:463
- Morizono H, Listrom CD, Rajagopal BS, Aoyagi M, McCann MT, Allewell NM, Tuchman M. Late onset ornithine transcarbamylase deficiency: function of three purified recombinant mutant enzymes. *Hum Mol Genet* 1997;**6**:963-968
- Msall M, Batshaw ML, Suss R, Brusilow SW, Mellits ED. Neurologic outcome in children with inborn errors of urea synthesis. *N Engl J Med* 1984;**310**:1500
- Nicolaides P, Liebsch D, Dale N, Leonard J, Surtees R. Neurological outcome of patients with ornithine carbamoyltransferase deficiency. *Arch Dis Child* 2002;**86**:54-56
- Pelet A, Rotig A, Bonaiti-Pellié C, Rabier D, Cormier V, Toumas E, Hentzen D, Saudubray JM, Munnich A. Carrier detection in a partially dominant X-linked disease: Ornithine transcarbamylase deficiency. *Hum Genet* 1990;**84**:167-171
- Plante RJ and Tuchman M. Polymorphism in the human ornithine transcarbamylase gene useful for allele tracking. Mutations in brief no. 193. Online. *Hum Mutat* 1998;**12**:289-290
- Porter RW, Modebe MO, Stark GR. Aspartat transcarbamylase: kinetic studies of the catalytic subunit. *J Biol Chem* 1969;**244**:1846-1859
- Raiha NCR, Suihkonen J. Development of urea-synthesizing enzymes in human liver. *Acta Paediatr Scand* 1968;**57**:121



- Raper SE, Yudcoff M, Chirmule N, Gao GP, Nunes F, Haskal ZJ, Furth EE, Properz KJ, Robinson MB, Magosin S, Simoes H, Speicher L, Hughes J, Tazelaar J, Wivel NA, Wilson JM, Batshaw ML. A pilot study of in vivo liver directed gene transfer with an adenoviral vector in partial ornithine transcarbamylase deficiency. *Hum Gene Ther* 2002;**13**:163-175
- Ricciuti FC, Gelehrter TD, Rosenberg LE. X-Chromosome Inactivation in Human Liver. Confirmation of X-Linkage of Ornithine Transcarbamylase. *Am J Hum Genet* 1976;**28**:332-338
- Rodeck CH, Patrick AD, Pembrey ME, Tsannatos C, Whitfield AE. Fetal liver biopsy for prenatal diagnosis of ornithine carbamyltransferase deficiency. *Lancet* 1982;**2**:297
- Rowe PC, Newman SL, Brusilow SW. Natural history of symptomatic partial ornithine transcarbamylase deficiency. *N Engl J Med* 1986;**314**:541-547
- Rozen R, Fox J, Hack AM, Fenton WA, Horwich AL, Rosenberg LE. DNA analysis for ornithine transcarbamylase deficiency. *J Inher Metab Dis* 1986;**9**:49-57
- Russell A, Levin B, Oberholzer UG, Sinclair L. Hyperammonämie, a new instance of an inborn enzymatic defect of the biosynthesis of urea. *Lancet* 1962;**2**:699-700
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1977;**74**:5463-5467
- Schouten JP, McElguun CJ, Waaijer R, Zwijnenburg D, Diepvens F, Pals G. Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. *Nucleic Acids Res* 2002;**30**:e57
- Shapiro MB, Senepathy P. RNA splice junctions of different classes of eukaryotes:sequence statistics and functional implications in gene expression. *Nucleic Acids Res* 1987;**15**:7155-7174
- Sheffield VC, Cox DR, Lerman LS, Myers RM. Attachment of a 40-base-pair G + C-rich sequence (GC-Clamp) to genomic DNA fragments by polymerase chain reaction results in improved detection of single-base changes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989;**86**:232-236
- Shi D, Morizono H, Ha Y, Aoyagi M, Tuchman M, Allewell NM. 1.85 Å resolution crystal structure of human ornithine transcarbamoylase complexed with N-phosphonacetyl-L-ornithine. *J Biol Chem* 1998;**273**:34247-34254
- Shi D, Morizono H, Aoyagi M, Tuchman M, Allewell NM. Crystal structure of human ornithine transcarbamylase complexed with carbamoyl phosphate and L-norvaline at 1.9 Å resolution. *Proteins: Struct Funct Genet* 2000;**39**:271-277
- Shi D, Morizono H, Yu X, Tong L, Allewell NM, Tuchman M. Human ornithine transcarbamylase: crystallographic insights into substrate recognition and conformational changes. *Biochem J* 2001;**354**:501-509

- Shiple GJ, Sherwin CP. Synthesis of glycocoll and glutamin in the human organism. *J Am Chem Soc* 1922;**44**:618
- Tuchman M, Tsai MY, Holzknecht RA, Brusilow SW. Carbamyl phosphate synthetase and ornithine transcarbamylase activities in enzyme-deficient human liver measured by radiochromatography and correlated with outcome. *Pediatr Res* 1989;**26**:77-82
- Tuchman M, Holzknecht RA, Gueron AB, Berry SA, Tsai MY. Six new mutations in the ornithine transcarbamylase gene detected by single-strand conformational polymorphism. *Pediatr Res* 1992;**5**:600-604
- Tuchman M. Mutations and polymorphisms in the ornithine transcarbamylase gene. *Hum Mutat* 1993;**2**:174-178
- Tuchman M, Plante RJ, McCann MT, Qureshi AA. Seven new mutations in the human ornithin transcarbamylse gene. *Hum Mutat* 1994;**4**:57-60
- Tuchman M, Matsuda I, Munnich A, Malcolm S, Strautnieks S, Briede T. Proportions of spontaneous mutations in males and females with ornithine transcarbamylase deficiency. *Am J Med Genet* 1995a;**55**:67-70
- Tuchman M, Plante RJ. Mutations and polymorphisms in the human ornithine transcarbamylase gene: mutation update addendum. *Hum Mutat* 1995b;**5**:293-295
- Tuchman M, Morizono H, Rajagopal BS, Plante RJ, Allewell NM. The biochemical and molecular spectrum of ornithine transcarbamylase deficiency. *J Inherit Metab Dis* 1998;**21**(1):40-58
- Tuchman M, McCullough BA., Yudkoff M. The molecular basis of ornithine transcarbamylase deficiency. *Eur J Pediatr* 2000;**159**:196-198
- Tuchman M, Jaleel N, Morizono H, Sheehy L, Lynch MG. Mutations and polymorphisms in the human ornithine transcarbamylase gene. *Hum Mutat* 2002;**19**:93-107
- Van der Hout AH, van den Ouweland AM, van der Lijdt RB, Gille HJ, Bodmer D, Bruggenwirth H, Molder IM, van der Vlies P, Elfferich P, Huisman MT, ten Berge AM, Kromosoeto J, Jansen RP, van Zon PH, Vriesman T, Arts N, Lange MB, Oosterwijk JC, Meijers-Heijboer H, Ausems MG, Hoogerbrugge N, Verhoef S, Halley DJ, Vos YJ, Hogervorst F, Ligtenberg M, Hofstra RM. A DGGE system for comprehensive mutation screening of BRCA1 and BRCA2: application in a Dutch cancer clinic setting. *Hum Mutat* 2006;**27**:654-666
- Valentini G, de Gregorio A, Di Salvo C, Grimm R, Bellocco E, Cuzzorea G, Iadarola P. An essential lysine in the substrate-binding site of ornithine carbamoyltransferase. *Eur J Biochem* 1996;**239**:397-402

Villeret V, Tricot C, Stalon V, Dideberg O. Crystal structure of *Pseudomonas aeruginosa* catabolic ornithine transcarbamoylase at 3.0 Å resolution: a different oligomeric organization in the transcarbamoylase family. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 1995;**92**:10762-10766

Villeret V, Clantin B, Tricot C, Legrain C, Roovers M, Stalon V, Glansdorff N, van Beeumen J. The crystal structure of *Pyrococcus furiosus* ornithine carbamoyltransferase reveals a key role for oligomerization in enzyme stability at extreme high temperature. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 1998;**95**:2801-2801

Webster LT, Siddiqui UA, Lucas SV, Strong JM, Mieyal JJ. Identification of separate Acyl-CoA-Glycin und Acyl-CoA-L-Glutamin N-Acyltransferase activities in mitochondrial fractions from liver of resus monkey and man. *J Biol Chem* 1976;**251**:3352

Whittington PF, Alonso EM, Boyle JT, Molleston JP, Rosenthal P, Emond JC, Millis JM. Liver transplantation for the treatment of urea cycle disorders. *J Inherit Metab Dis* 1998;**21**:112-118

Wu CI, Maeda N. Inequality in mutation rates of the two strands of DNA. *Nature* 1987;**327**:169-170

Yamaguchi S, Brailey LL, Morizono H, Bale AE, Tuchman M. Mutations and polymorphisms in the human ornithine transcarbamylase (OTC) gene. *Hum Mutat* 2006;**27**:626-632

Yudkoff M, Daikhin Y, Nissim I, Jawad A, Wilson J, Batshaw M. In vivo nitrogen metabolism in ornithine transcarbamylase deficiency. *J Clin Invest* 1996;**98**:2167-2173

Zenker M, Wermuth B, Trautmann U, Knerr I, Kraus C, Rauch A, Reis A. Severe, neonatal-onset OTC-deficiency in twin sisters with a de novo balanced reziprocal translocation t (X;5)(p21.1;q11). *Am J Med Genet A* 2005;**132A**(2):185-188

Zschocke/Hoffmann 2004: Vademecum Metabolicum. Diagnose und Therapie erblicher Stoffwechselkrankheiten. 3. Auflage, Schattauer, S.51, S.62

## ***Akademische Lehrer***

Meine akademischen Lehrer waren die Damen und Herren, Professoren und Dozenten.

In Marburg:

Arnold, Aumüller, Aurich, Bandmann, Barth, Basler, Baum, Christiansen, Czubayko, Daut, Doss, Elsässer, Feuser, Geus, Gotzen, Griss, Happle, Hasilik, Hellinger, Hesse, Hoffmann, Hofmann, Jungclas, Kern, Kirchner, Klenk, Klose, Koolmann, Kretschmer, Krieg, Lennartz, Maisch, Melsheimer, Moll, Moosdorfer, Müller, Mutters, Oertel, Reichardt, Remschmidt, Rogausch, Röhm, Rothmund, Schäfer, Schmidt, Seitz, Vohland, Voigt, Weihe, Werner, Westermann, Westphal, Zschocke

In Hamburg: Braun, Carstensen, Kremer, Mondt, Siemers

In Zürich: Dietrich, Genoni, Gürtler, Metzger, Platz, Schnider, Tavakoli, Turina

## ***Danksagung***

Ich möchte mich bei meinem Doktorvater Prof. Dr. Dr. med. Johannes Zschocke für die Überlassung des interessanten Themas sowie die zuverlässige Zusammenarbeit und konstruktive Unterstützung herzlich bedanken. Er hat es in bezeichnender Weise immer wieder geschafft, meine Begeisterung für meine Arbeit zu wecken und mich somit über das Ziel hinaus gebracht.

Mein Dank gilt ebenso Prof. Dr. med. Prof. h.c. (RCH) Georg F. Hoffmann, der die Bearbeitung des Themas in seiner Abteilung unterstützt hat.

Für die Bereitstellung der Proben möchte ich Herrn Dr. Bakker / Leiden (Niederlanden), Herrn Dr. Santer / Kiel (Deutschland) sowie Herrn Prof. Dr. Wermuth / Bern (Schweiz) sowie für die Zusammenarbeit Prof. Dr. G. Wolff, Institut für Humangenetik Freiburg danken. Elfriede Quak möchte ich für die nette Zusammenarbeit im Labor danken.

Frau Dr. med. H. Marschner-Schäfer sowie Frau Dr. med. U. Peters und Frau Dr. med. S. Kleier danke ich für die großzügige Unterstützung meiner Arbeit neben meiner beruflichen Tätigkeit. Herrn Dr. rer. nat. M. Kutsche danke ich für das stets offene Ohr zu Fragen fern von Heidelberg.

Besonderer Dank gilt meinen Eltern für die stets rückhaltlose Unterstützung meines Werdeganges und meiner Schwester Kerstin, welche mich großartig bei den Korrekturarbeiten des Manuskriptes unterstützt hat.

Nicht vergessen möchte ich die Großeltern meines Ehemannes, welche durch ihr immer gezeigtes Interesse das Fertigstellen meiner Arbeit begleitet haben.

Von ganzem Herzen danke ich meinem lieben Ehemann Friedrich-Alexander, der mir als begnadeter Optimist immer ein „halbvolltes Glas“ signalisierte.